

Charakterisierung putativer Cofaktoren der Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung

Inaugural Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades

Dr.rer.nat.

des Fachbereichs Bio- und Geowissenschaften, Landschaftsarchitektur

an der

Universität GH Essen

vorgelegt von

Diemo Michels

aus Bochum

August 1999

Die der vorliegenden Arbeit zugrundeliegenden Experimente wurden am Institut für Zellbiologie (Tumorforschung) der Universität GH Essen durchgeführt.

1. Gutachter: PD Dr. L. Klein-Hitpaß

2. Gutachter: Prof. Dr. T. Möröy

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: PD Dr. T. H. Lumbsch

Tag der mündlichen Prüfung: 8. Dezember 1999

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem. § 6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema „Charakterisierung putativer Cofaktoren der Progensteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung“ zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Diemo Michels befürworte.

Essen, 25.08. 1999

PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem § 6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

Essen, 25.08. 1999

Diemo Michels

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, gem § 6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 zur Erlangung des Dr. rer. nat., daß ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und daß diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

Essen, 25.08. 1999

Diemo Michels

INHALTSVERZEICHNIS

EINLEITUNG

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

- 1 *Der Initiationskomplex der RNA-Polymerase II katalysierten Transkription* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 2 *Modulare Domänenstruktur der Steroidhormon-Rezeptoren* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 3 *Mechanismus der Transaktivierung durch Steroidhormon-Rezeptoren* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 4 *Beteiligung von Cofaktoren an der Transaktivierung durch Steroidhormon-Rezeptoren* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 5 *Zielsetzung* Fehler! Textmarke nicht definiert.

MATERIALIEN UND METHODEN

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

- 1 *Chemikalien und Enzyme* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 2 *Bakterien und Bakterienkultur* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.1 *Transformation von E. coli* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.2 *Präparation von Plasmid-DNA* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.3 *Expression von GST-Fusionsproteinen in E. coli* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 3 *Zelllinien und Zellkultur* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.1 *Transiente Transfektionen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.2 *Präparation von Ganzzelextrakten* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.3 *in vivo Proteinmarkierung* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 4 *in vitro Transkription/Translation im Reticulocyten-Lysat* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 5 *Bestimmung von Proteinkonzentrationen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 6 *Gelelektrophorese* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 6.1 *Native Agarosegelelektrophorese* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 6.2 *Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 6.3 *Native Polyacrylamidgelelektrophorese* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 6.4 *Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 6.5 *SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 7 *Detektion von Nukleinsäuren* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 7.1 *Northern-Analysen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 7.2 *Southern-Analysen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 7.3 *RNase Protektionsanalysen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 8 *Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 9 *Primer Extensionsanalyse* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 10 *GST-Fusionsprotein Interaktionsanalyse* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 11 *Immunchemische Methoden* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 11.1 *Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 11.2 *Western-Analysen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 11.3 *Immunfluoreszenzanalysen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 11.4 *Immunpräzipitationen* Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 12 *Gelretardationsanalysen* Fehler! Textmarke nicht definiert.

ERGEBNISSE

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

- 1 *Vorarbeiten* *Fehler! Textmarke nicht definiert.*
- 2 *Charakterisierung von 114-2* *Fehler! Textmarke nicht definiert.*
 - 2.1 **Isolierung und Analyse der codierenden cDNA-Sequenz** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.2 **Expression der codierenden 114-2 Sequenz *in vitro*** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.3 **Detektion des 114-2 Proteins durch einen spezifischen Antikörper** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.4 **Analyse der Interaktion zwischen 114-2 und dem Progesteron-Rezeptor** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.5 **Einfluß von 114-2 auf die Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor** Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 3 *Charakterisierung von 116* *Fehler! Textmarke nicht definiert.*
 - 3.1 **Analyse der Expression von 116 mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.2 **Isolierung der vollständigen codierenden cDNA-Sequenz von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.3 **Analyse auf alternatives Spleißen von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.4 **Analyse der Nukleotidsequenz von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.5 **Bestimmung der genomischen Struktur des 116 Gens** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.6 **Untersuchung auf ein unbekanntes Exon von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.7 **Bestimmung des Transkriptionsstarts** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.8 **Detektion des 116 Proteins** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.9 **Nachweis von 116 in Rattenuteri** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.10 **Bestimmung der subzellulären Lokalisation von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.11 **Analyse der *in vitro* Interaktion von 116 mit dem Progesteron-Rezeptor** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.12 **Analyse der Interaktionen von 116 *in vivo*** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.13 **Analyse auf Fähigkeit zur DNA-Bindung von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.14 **Untersuchung auf eine interne Aktivierungsfunktion** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 3.15 **Einfluß von 116 auf die Progesteron-Rezeptor Transaktivierung** Fehler! Textmarke nicht definiert.

DISKUSSION

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

- 1 *Charakterisierung von 114-2* *Fehler! Textmarke nicht definiert.*
 - 1.1 **Bestimmung der vollständigen codierenden cDNA und Analyse der codierten Proteinmotive von 114-2** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 1.2 **Interaktion zwischen 114-2 und dem Progesteron-Rezeptor** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 1.3 **Einfluß von 114-2 auf die Progesteron-Rezeptor vermittelte Transaktivierung** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 1.4 **Das Protein von 114-2 könnte von einer bicistronischen mRNA codiert sein** Fehler! Textmarke nicht definiert.
- 2 *Charakterisierung von 116* *Fehler! Textmarke nicht definiert.*
 - 2.1 **Isolierung der vollständigen codierenden 116 cDNA-Sequenz** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.2 **Konstante ubiquitäre Expression und cytoplasmatische Lokalisation von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.3 **Analyse der vielfältigen möglichen Interaktionen von 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.
 - 2.4 **Analyse der Transkriptionsregulation durch 116** Fehler! Textmarke nicht definiert.

ZUSAMMENFASSUNG

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

LITERATURVERZEICHNIS

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

DANKSAGUNG

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

LEBENS LAUF

FEHLER! TEXTMARKE NICHT DEFINIERT.

EINLEITUNG

1 *Der Initiationskomplex der RNA-Polymerase II katalysierten Transkription*

Jeder einzelne Organismus besteht aus einer Vielzahl von Zellen, die sich in ihrer Organisation, Morphologie und Funktion stark unterscheiden. Die Vielfalt an Form und Funktion resultiert aus der räumlich und zeitlich koordinierten Expression der Erbinformation. Der erste Schritt zur Expression ist die Transkription. Die Regulation ihrer Initiation ist daher entscheidend für die Ontogenese und für die Funktionalität der Zelle im adulten Organismus.

Die Transkription wird in eukaryonten Organismen von drei verschiedenen DNA-abhängigen RNA-Polymerasen katalysiert (Chambon, 1975). Die RNA-Polymerase I transkribiert die ribosomalen RNAs (Dickinson et al., 1990), während die RNA-Polymerase III für die Bildung der 5S-RNA, der tRNAs und einer Anzahl funktioneller kleiner RNAs verantwortlich ist (Weinmann and Roeder, 1974; Geiduschek and Tocchini-Valentini, 1988; Zieve et al., 1977; Reddy et al., 1987). Die RNA-Polymerase II transkribiert neben einer Reihe kleiner RNAs die Protein codierenden Gene. Trotz ihrer Komplexität (zwölf konservierte Untereinheiten bei der Hefe; Woychik and Young, 1990) benötigt die RNA-Polymerase II zur korrekten Initiation der Transkription zusätzlich sechs Generelle Transkriptionsfaktoren (GTFs), die mit TFIIA, -B, -D, -E, -F und -H bezeichnet werden (Roeder et al., 1976; Weil et al., 1979; Matsui et al., 1980). Die spezifische Initiation erfolgt durch Ausbildung eines Präinitiationskomplexes aus den sechs GTFs und der RNA-Polymerase II am „Core“-Promotor des Gens (Roeder, 1996). Zu den „Core“-Promotor Elementen gehören die TATA-Box, die etwa dreißig Nukleotide stromaufwärts vom Transkriptionsstart liegt und das Pyrimidin reiche Initiator Element (Inr) direkt am Transkriptionsstart (Weis and Reinberg, 1992; Smale and Baltimore, 1989). Weitere Publikationen postulieren als zusätzliche „Core“-Promotor Elemente eine direkt stromaufwärts der TATA-Box gelegene Bindungsstelle für TFIIB, das BRE („TFIIB recognition element“, (Lagrange et al., 1998) und ein Sequenzelement, das etwa dreißig Nukleotide stromabwärts vom Transkriptionsstart liegt („downstream promoter element“, DPE; Burke and Kadonaga, 1996). Die „Core“-Promotor Elemente können synergistisch aber auch unabhängig voneinander wirken (Orphanides et al., 1996). Daher besitzt nicht jedes Gen alle diese Elemente, noch gleichen sich ihre Sequenz und Lage zueinander in verschiedenen Promotoren (Roeder, 1996). TFIID nimmt eine Schlüsselposition bei der Ausbildung des Präinitiationskomplexes ein, da es gleich drei „Core“-Promotor Elemente, sowohl die TATA-Box als auch den Initiator und das DPE, erkennen kann (Goodrich et al., 1996; Burke and Kadonaga, 1996). Durch biochemische Analysen konnte TFIID als stabiler Komplex aus dem TATA-Box-bindenden Protein (TBP) und acht TBP-assoziierten Faktoren (TAFs) identifiziert werden (Dynlacht et al., 1991; Tanese and Tjian, 1993). Die TATA-Box wird spezifisch von der TBP-Untereinheit des TFIID-Komplexes gebunden (Buratowski et al., 1988), während der Initiator und das DPE von bestimmten TAFs erkannt werden (Verrijzer et al., 1994; Burke and Kadonaga, 1996; Orphanides et al., 1996). Nach Bindung von TFIID an die DNA werden die übrigen GTFs zusammen mit der RNA-Polymerase II rekrutiert. Inwiefern eine schrittweise Rekrutierung der GTFs und der RNA-Polymerase II an den „Core“-Promotor erfolgt oder ein vorgebildeter Holoenzymkomplex an die DNA bindet, wird derzeit noch konträr diskutiert (Ranish et al., 1999; Myer and Young, 1998; Koleske and Young, 1994; Conaway and Conaway, 1993; Zawel and Reinberg, 1993; Buratowski et al., 1989).

Der Komplex aus den GTFs und der RNA-Polymerase II am „Core“-Promotor ist *in vitro* in der Lage, eine geringe Transkription des Zielgens zu initiieren, die als basale Transkription bezeichnet wird (Roeder, 1996). Die Promotoren Protein codierender Gene enthalten jedoch neben dem „Core“-Promotor genspezifische DNA-Elemente, an die Transkriptionsfaktoren binden, welche die Transkriptionsrate erhöhen (Hernandez, 1993). Diese Transkriptionsfaktoren besitzen meist einen modularen Aufbau aus einer DNA-Bindungsdomäne und einer oder mehrerer Aktivierungsdomänen (Verrijzer und Tjian 1996). Nach der Bindung an die spezifischen DNA-Sequenzen beeinflussen die Transkriptionsfaktoren die Ausbildung, Konformation, Aktivität und Stabilität des Präinitiationskomplexes durch direkte oder indirekte Interaktion (Hernandez 1993; Tjian and Maniatis, 1994; Goodrich et al., 1996). So konnte eine direkte Interaktion mit TBP für Transkriptionsfaktoren, wie E2 („immediately early protein 2“) des Cytomegalovirus und E1A des Adenovirus gezeigt werden (Hagemeier et al., 1992; Horikoshi et al., 1991). Außerdem bindet die Aktivierungsdomäne des Herpes simplex Transkriptionsfaktors VP16 nicht nur an TBP, sondern auch an TFIIB, TFIID und an *Drosophila* TAF40 bzw. an das humane Homolog TAF32 (Stringer et al., 1990; Lin et al., 1991; Goodrich et al., 1993; Xiao et al., 1994; Klemm et al., 1995). Daß manche TAFs dazu dienen, Aktivierungsdomänen funktionell mit den GTFs zu verbinden, wurde durch *in vitro* Rekonstitutionsanalysen gezeigt (Pugh and Tjian, 1990; Dynlacht et al., 1991). Danach kann eine Aktivierung der Transkription durch Transkriptionsfaktoren mit partiell gereinigtem TFIID, aber nicht mit gereinigtem TBP erzielt werden, während TAFs für die basale Transkription weder notwendig sind noch stimulierend wirken. Einige TAFs übernehmen eine Brückenfunktion zwischen den Transkriptionsfaktoren und den GTFs mit der RNA-Polymerase II,

die eine Stimulierung der Transkriptionsinitiation bewirkt. So konnte gezeigt werden, daß dTAF110 an den Progesteron-Rezeptor und hTAF30 an den Östrogen-Rezeptor bindet (Schwerk et al., 1995; Jacq et al., 1994). NTF-1 bindet an dTAF60 und dTAF150 und Sp1 selektiv an TAF110, wobei letztere Interaktion stark mit der Aktivierung der Transkription korreliert (Verrijzer et al., 1994; Hoey et al., 1993; Gill et al., 1994).

2 *Modulare Domänenstruktur der Steroidhormon-Rezeptoren*

Die Kern-Rezeptoren bilden die größte bekannte Familie von Transkriptionsfaktoren in Eukaryonten. Zu ihnen zählen die Rezeptoren für Retinoide, Thyroide, Vitamin D₃, Ecdyson, die Orphan-Rezeptoren und die Steroidhormon-Rezeptoren (SRs) (Tsai and O'Malley, 1994). Die Struktur der Kern-Rezeptoren, insbesondere der Steroidhormon-Rezeptoren, ist durch einen modularen Aufbau gekennzeichnet (Tsai and O'Malley, 1994; Green and Chambon, 1986; Krust et al., 1986). Die aminoterminal gelegene A/B-Domäne ist unter den Mitgliedern der Steroidhormon-Rezeptorfamilie wenig konserviert und sehr variabel in ihrer Sequenz und Länge. Fusioniert an eine heterologe DNA-Bindungsdomäne besitzt diese Region eine konstitutive Aktivierungsfunktion, die auch als AF1 bezeichnet wird (Giguere et al., 1986; Kumar et al., 1987; Hollenberg and Evans, 1988). Die Aktivierung wird dabei vermutlich über die Interaktion mit den GTFs oder anderen Transkriptionsfaktoren vermittelt. Zudem könnte diese Domäne eine wichtige Rolle bei der Bestimmung der Zielgenspezifität der unterschiedlichen Isoformen spielen, die an die gleiche Erkennungssequenz binden (Tora et al., 1988; Bocquel et al., 1989). Zentral im Protein liegt die konservierte C-Domäne, bestehend aus zwei C₂C₂-Zinkfingermotiven, die neben der DNA-Bindung auch noch zur Dimerisierung der Rezeptoren beiträgt (Evans, 1988; Luisi et al., 1991; Freedman, 1992). Außerdem besitzt diese Domäne im Fall des Progesteron-Rezeptors wahrscheinlich auf Grund der Interaktion mit TAF110 eine dritte Aktivierungsfunktion (AF3) (Schwerk et al., 1995). Carboxyterminal zur C-Domäne ermöglicht die variable D-Region (auch „hinge-region“) vermutlich Konformationsänderungen des Proteins und vermittelt bei vielen Mitgliedern der Familie außerdem die Kernlokalisierung (Godowski et al., 1988; Picard and Yamamoto, 1987; Guiochon-Mantel et al., 1989). Die E-Domäne ist mit ungefähr 250 Aminosäuren die größte Domäne der Steroidhormon-Rezeptoren und zudem funktionell komplex. Neben einem weiteren Dimerisierungsmotiv trägt sie zur Kernlokalisierung bei und enthält Regionen für die Assoziation von Hitzeschock-Proteinen. Die wohl wichtigste Funktion der E-Domäne besteht in der Bindung des spezifischen Liganden und die davon abhängige Transaktivierung, die Aktivierungsfunktion 2 (AF-2; Evans, 1988; Tsai and O'Malley, 1994). Die Bindung des Hormons wird durch Mutationen beeinflusst, die nahezu die gesamte Domäne betreffen können, weswegen diese Domäne allgemein auch als Ligandenbindungsdomäne bezeichnet wird. Am Carboxyterminus mancher Rezeptoren findet sich zusätzlich noch die F-Domäne, für die bisher keine eindeutige Funktion festgelegt werden konnte.

3 *Mechanismus der Transaktivierung durch Steroidhormon-Rezeptoren*

Charakteristisch für die Kern-Rezeptoren ist ihre induzierbare Aktivität. Als Induktor der Untergruppe der SRs dienen die Steroidhormone, die von endokrinen Zellen in die Blutbahn sezerniert werden, durch passiven oder aktiven Transport in die Zellen gelangen und im Cytoplasma oder im Zellkern an den Rezeptor binden (Tsai and O'Malley, 1994). In der inaktiven Form liegen die Rezeptoren in Form von Komplexen mit Hitzeschock-Proteinen und anderen Chaperonen vor (Pratt et al., 1988; Smith and Toft, 1993; Pratt, 1993; Bohen, 1995a). Diese Komplexe zeichnen sich durch eine große Affinität zum Hormon und eine geringe DNA-Bindungsfähigkeit aus. Die Erkennung des Liganden bewirkt eine Konformationsänderung und die Phosphorylierung des Rezeptors, der losgelöst von den Chaperonen als Homodimer an die verantwortlichen Elemente in der Nähe der Kern-Promotoren von Zielgenen bindet (Bohen et al., 1995b; DeMarzo et al., 1991; Sheridan et al., 1989; Orti et al., 1992). Dabei stellen die verantwortlichen Elemente der Steroidhormon-Rezeptoren imperfekte, invertierte Palindrome dar (von der Ahe et al., 1985; Strahle et al., 1987; Klein-Hitpass et al., 1988; Klein-Hitpass et al., 1989; Cato et al., 1988). Gebunden an die verantwortlichen Elemente aktivieren die Rezeptoren die Expression der Zielgene. In zellfreien *in vitro* Transkriptionssystemen konnte gezeigt werden, daß die Steroidhormon-Rezeptoren in der Lage sind, die Transkription sowohl von natürlichen als auch von minimalen Promotoren zu stimulieren. Die Transaktivierung wurde dabei zunächst allein auf eine direkte Interaktion der Rezeptoren mit den GTFs zurückgeführt. So konnte die Bindung an TFIIB für den Östrogen- wie für den Progesteron-Rezeptor demonstriert werden (Banahmad et al., 1993; Ing et al., 1992). Während dabei die Ligandenbindungsdomäne des Östrogen-Rezeptors für die Wechselwirkung notwendig ist, bindet TFIIB auch an ein Konstrukt des Progesteron-Rezeptors ohne die carboxyterminale Ligandenbindungsdomäne. Zusätzlich vermitteln die Ligandenbindungsdomäne des Östrogen-Rezeptors und die DNA-Bindungsdomäne des Progesteron-Rezeptors Interaktionen mit hTAF30 bzw. dTAF110 (Jacq et al., 1994; Schwerk et al., 1995). Der Östrogen-Rezeptor bindet außerdem über beide Aktivierungsfunktionen (AF1 und AF-2) an TBP (Sadovsky et al., 1995). Die Steroidhormon-Rezeptoren setzen demnach unterschiedliche Domänen für die Interaktion mit den GTFs ein.

4 *Beteiligung von Cofaktoren an der Transaktivierung durch Steroidhormon-Rezeptoren*

Die Interaktion mit den GTFs ist für die Aktivierung der basalen Transkription durch die Steroidhormon-Rezeptoren nicht ausreichend. Hinweise auf Cofaktoren gaben Ergebnisse, die als Transkriptionsinterferenz oder „Sequesting“ bezeichnet werden. Die Überexpression einer Aktivierungsfunktion eines Steroidhormon-Rezeptors übt dabei einen negativen Einfluß auf die durch einen Steroidhormon-Rezeptor vermittelte Transaktivierung eines Promotors aus, während die Transkription von einem Promotor ohne Rezeptorbeteiligung unbeeinflusst bleibt (Meyer et al., 1989). Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß die Aktivierungsfunktionen um die Interaktion mit notwendigen Cofaktoren in limitierenden Mengen konkurrieren. Wie bestimmte TAFs, dienen diese Cofaktoren entweder als Brückenprotein zwischen den Rezeptoren und den GTFs oder beeinflussen auf eine andere Weise die Ausbildung und Stabilität des Präinitiationskomplexes.

In Protein-Protein-Interaktionsanalysen wurden zahlreiche Cofaktoren auf Grund ihrer Wechselwirkung mit den Kern-Rezeptoren identifiziert (Cavaillès et al., 1995; Halachmi et al., 1994; Eggert et al., 1995; Onate et al., 1995; Zeiner and Gehring, 1995; Hong et al., 1996). Als zur Zeit erfolgreichste Methode zur Identifizierung von Interaktionen mit unbekannten Cofaktoren hat sich das Hefe-„two-hybrid“-System bewährt (Fields and Song, 1989). Bei diesem System wird in Hefen ein Zielprotein als Fusionsprotein mit der DNA-Bindungsdomäne des Hefe Gal4-Aktivators exprimiert. Als Zielprotein dient eine bekannte Peptidsequenz, für die angenommen wird, daß sie eine Interaktionsdomäne mit anderen Proteinen darstellt. Zum Teil wurden für diese Analysen bereits einzelne Domänen der Rezeptoren eingesetzt, um spezifisch an diese Domänen bindende Proteine zu bestimmen. Häufig fand die carboxyterminale Ligandenbindungsdomäne der Steroidhormon-Rezeptoren mit der hormonabhängigen AF2 Anwendung. Anschließend erfolgt die Transformation von Konstrukten, in denen unbekannte cDNA-Sequenzen an die codierende Sequenz der Gal4-Aktivator-domäne gekoppelt sind. Bei Interaktion des Zielproteins mit der exprimierten cDNA wird der Gal4-Aktivator rekonstituiert. Gal4-responsive Reportergene eines entsprechenden Reporterplasmids können so aktiviert werden. An Hand der Expression der Reportergene lassen sich diejenigen Hefen selektionieren, die die Expressionsplasmide für interagierende Domänen besitzen. Diese Expressionsplasmide können dann isoliert, amplifiziert und der cDNA-Anteil sequenziert werden. Auf diese Weise erhält man direkten Zugang zu der codierenden Sequenz für ein interagierendes Protein.

Mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems ist durch Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne des Progesteron-Rezeptors ein Coaktivator identifiziert worden, der als Steroidhormon-Rezeptor Coaktivator 1 (SRC-1) bezeichnet wird und zusammen mit TIF2 und p/CIP zur Familie der p160-Coaktivatoren zählt (Onate et al., 1995; Voegel et al., 1996; Torchia et al., 1997). Die Interaktion zwischen SRC-1 und dem Progesteron-Rezeptor erfolgt in der Hefe hormonabhängig und konnte *in vitro* mit Hilfe von GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen bestätigt werden (Onate et al., 1995). Abgesehen von der hormonabhängigen Interaktion mit den Steroidhormon-Rezeptoren wird SRC-1 auch unabhängig von einem Liganden durch Cyclin D1 an den Östrogen-Rezeptor rekrutiert (Zwijsen et al., 1998). Mit der direkten Beteiligung von Cyclin D1 an der Regulation der Transkription ist ein alternativer Weg der Transaktivierung durch den Östrogen-Rezeptor in Brust-Carcinom-Zellen gezeigt worden, bei dem Coaktivatoren eine bedeutende Rolle in der Tumorgenese zukommt.

Über einen weiteren Weg wird SRC-1 ligandenunabhängig an den Östrogen-Rezeptor rekrutiert (Tremblay et al., 1999). Nach Phosphorylierung der AF1 des Östrogen-Rezeptors β durch die MAP Kinase kann *in vitro* die Bindung von SRC-1 nachgewiesen werden. Auch *in vivo* rekrutiert der Östrogen-Rezeptor den Coaktivator nach Behandlung der Zellen mit EGF, das den MAP Kinase Signalweg aktiviert. Der direkte Nachweis einer durch diese Interaktion veränderten Transaktivierung steht jedoch noch aus.

Ein Einfluß von SRC-1 auf die Transaktivierung wurde mittels transienter Transfektionen untersucht (Onate et al., 1995). So konnte die bereits durch den Progesteron-Rezeptor hormonabhängig aktivierte Transkription mit SRC-1 nochmals um den Faktor 14 gesteigert werden, während die basale Transkription unbeeinflusst blieb. Stimuliert wurden auch die Transaktivierungen des Östrogen-, Glucocorticoid-, Thyroidhormon- und Retinsäure-X-Rezeptors, aber auch von Aktivatoren, die nicht der Kern-Rezeptor-Familie angehören, wie Sp1 und VP16 (Onate et al., 1995). In Hinsicht auf den Östrogen-Rezeptor konnte gezeigt werden, daß SRC-1 die intramolekulare Assoziation der beiden Aktivierungsfunktionen fördert oder gar ermöglicht und auf diese Weise zur Verstärkung der transkriptionellen Aktivierung beiträgt (McInerney et al., 1996). SRC-1 ist jedoch kein universeller Coaktivator aller Transkriptionsfaktoren, da die Aktivierungen durch E2F, E47 und CREB unbeeinflusst bleiben. Wichtig ist, daß SRC-1 in der Lage ist, die Interferenz zwischen Östrogen- und Progesteron-Rezeptor aufzuheben. Damit stellt SRC-1 einen der limitierenden Faktoren bei der hormonabhängigen Transaktivierung von Kern-Promotoren durch Steroidhormon-Rezeptoren dar (Onate et al., 1995).

Direkte Interaktionen stellen jedoch nicht die einzige Form dar, mit der SRC-1 in der Lage ist, die Transkription zu stimulieren. Eine spezifische Histon acetylierende Funktion für die Histone H3 und H4 trägt durch Auflockerung der nukleosomalen Struktur dazu bei, die inhibitorischen Einflüsse des Chromatins auf die Transkription zu mildern, indem auf diese Weise die Stabilität der Bindung des Präinitiationskomplexes an die DNA erhöht wird (Spencer et al., 1997). Zudem rekrutiert SRC-1 wiederum über direkte Interaktionen die Coaktivatoren CBP/p300 und P/CAF, die ihrerseits Histon acetylierende Eigenschaften besitzen und über den Transkriptionsfaktor Twist reguliert werden

können (Martinez-Balbas et al., 1998; Hanstein et al., 1996; Yao et al., 1996; Blanco et al., 1998; Hamamori et al., 1999).

An Hand von „knock-out“-Mäusen wurde die Funktion von SRC-1 *in vivo* untersucht (Xu et al., 1998). Während sich die heterozygot mutierten Mäuse vom Wildtyp nicht unterschieden, zeigten die homozygoten Mutanten einen schwachen Phänotyp hinsichtlich der Zielgewebe von Östrogen und Progesteron. So konnte jedoch erst nach Hormonstimulus - ein leicht vermindertes Wachstum des Uterus, der Prostata, des Hodens und der Brustdrüsen festgestellt werden. Die geringen Auswirkungen der Deletion von SRC1 wurden auf eine zweifach erhöhte Expression des verwandten Coaktivators TIF2 zurückgeführt. Der Ausfall bestimmter Coaktivatoren kann daher vermutlich durch redundante Faktoren und kompensatorische Mechanismen ausgeglichen werden. Auf Grund der genannten Untersuchungen stellt SRC1 den bisher am Besten charakterisierten Cofaktor dar.

Ein weiteres Mitglied der p160-Coaktivator-Familie, GRIP1, wurde mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems auf Grund der Wechselwirkung mit der Ligandenbindungsdomäne des Glucocorticoid-Rezeptors aus einer embryonalen Maus-cDNA-Bank isoliert (Hong et al., 1996). Das humane Homolog TIF2 wurde fast gleichzeitig zu GRIP1 aus einer Placenta-cDNA-Bank an Hand der Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne des Östrogen-Rezeptors identifiziert (Voegel et al., 1996). TIF2/GRIP1 bindet in Abhängigkeit von Hormon aber auch an die Ligandenbindungsdomänen aller übrigen Steroidhormon-Rezeptoren und an mehrere untersuchte Kern-Rezeptoren (Hong et al., 1997; Voegel et al., 1996). Die Interaktion mit unterschiedlichen Rezeptoren wird dabei über den differentiellen Gebrauch verschiedener Domänen vermittelt (Voegel et al., 1998; Hong et al., 1999). TIF2/GRIP1 zeigt Sequenzähnlichkeiten zu SRC-1 insbesondere im Aminoterminus (Voegel et al., 1996; Hong et al., 1997). Auch funktionell ähnelt TIF2/GRIP1 dem beschriebenen Coaktivator SRC1, da es in der Lage ist, die Transaktivierung mehrerer Kern-Rezeptoren hormonabhängig zu stimulieren und auch eine eigene Aktivierungsfunktion besitzt (Hong et al., 1996; Voegel et al., 1996). Zudem ist TIF2 in der Lage, die Inhibierung der Transaktivierung durch Überexpression des Östrogen-Rezeptors teilweise wieder aufzuheben (Voegel et al., 1996). Damit stellt TIF2/GRIP1 einen der limitierenden Cofaktoren bei der Transaktivierung durch Kern-Rezeptoren dar.

Gleich mehrfach auf verschiedene Weise wurde das dritte Mitglied der p160-Coaktivator-Familie isoliert und daher unterschiedlich mit pCIP („p300/CBP-co-integrator-associated protein“; Torchia et al., 1997), ACTR (Herkunft der Bezeichnung unklar; Chen et al., 1997), AIB1 („amplified in breast cancer-1“; Anzick et al., 1997) und RAC3 („receptor-associated coactivator 3“; Li et al., 1997) bezeichnet. Dieser Coaktivator zeigt große Ähnlichkeiten zu den anderen Mitgliedern der p160-Familie sowohl in der Domänenstruktur als auch in der Aminosäuresequenz, die mit 60 % identischer Aminosäuren in der aminoterminalen PAS/bHLH-Domäne am höchsten ist (Chen et al., 1997). Wie SRC-1 und TIF2/GRIP1 interagiert auch pCIP hormonabhängig mit Steroidhormon- und anderen Kern-Rezeptoren, sowie mit CBP/p300 und P/CAF, und steigert die Transaktivierung von Zielgenen durch die entsprechenden Rezeptoren (Torchia et al., 1997; Chen et al., 1997; Li et al., 1997). Außerdem konnte für diesen Coaktivator, wie für SRC-1, eine Histone acetylierende Aktivität nachgewiesen werden (Chen et al., 1997). Die erhöhte Expression von pCIP in Ovar- und Brustcarcinomen läßt eine bedeutende Beteiligung der p160-Coaktivator-Familie an der Entwicklung von Tumoren vermuten (Anzick et al., 1997).

Als eine neue Klasse von Coaktivatoren wurde SRA mittels Hefe-„two-hybrid“-System entdeckt (Steroidhormon-Rezeptor RNA Aktivator; Lanz et al., 1999). Im Gegensatz zu den Mitgliedern der p160-Coaktivator-Familie ist SRA trotz der funktionellen Ähnlichkeiten kein Protein, sondern erfüllt vermutlich als RNA seine Aufgaben in der Zelle. Eindeutig geklärt werden muß jedoch noch, wie SRA als interagierende RNA über eine Proteininteraktionsanalyse isoliert werden konnte.

Der erste entdeckte Cofaktor, RIP140, wurde an Hand der *in vitro* Interaktion mit dem Östrogen-Rezeptor identifiziert (Cavaillès et al., 1994) und nochmals unabhängig mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems isoliert (Treuter et al., 1998). Die cDNA von RIP140 wurde mit Hilfe einer humanen Expressionsbibliothek auf Grund der Interaktion mit der AF-2 des Östrogen-Rezeptors bestimmt. Die Interaktion ist hormonabhängig und wird durch Mutation in einer konservierten Region der AF2, die für die Transaktivierung notwendig ist, unterbunden (Danielian et al., 1992). In Cotransfektionsanalysen konnte gezeigt werden, daß RIP140 die Aktivierung eines Östrogen-Rezeptor-responsiblen Reportergens etwa zweifach stimuliert. Auch in Form eines Fusionsproteins mit einer heterologen DNA-Bindungsdomäne aktiviert RIP140 die Transkription eines responsiblen Reportergens (Horset et al., 1996). Spätere Untersuchungen zeigten die Interaktion von RIP140 auch mit anderen Kern-Rezeptoren (Horset et al., 1996). Zunächst wurde daher RIP140 eine Funktion als universeller Coaktivator von Kern-Rezeptoren zugesprochen (Cavaillès et al., 1994). Mittlerweile deuten weitere Daten darauf hin, daß RIP140 eine Regulation der Transaktivierung durch Kompetition mit den Coaktivatoren der p160-Familie ausübt (Treuter et al., 1998).

Die Identifizierung und Charakterisierung von Cofaktoren leistet demnach einen großen Beitrag zum Verständnis der Transkriptionsregulation und der damit verbundenen Auswirkungen auf die Entwicklung und Funktion von Zellen und Geweben.

5 Zielsetzung

Mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems wurden in unserer Arbeitsgruppe zwei cDNA-Klone isoliert, die eine hormonabhängige Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne des Progesteron-Rezeptors zeigten. Sie wurden als 114-2 und 116 bezeichnet und stellen gute Kandidaten für Cofaktoren der Transkriptionsaktivierung durch Steroidhormon-Rezeptoren dar (Schwerk, 1996). Ziel dieser Arbeit ist, diese beiden putativen Cofaktoren der Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung im Hinblick auf ihre biologischen und biochemischen Eigenschaften zu charakterisieren. Dabei soll besonders das Zusammenspiel von 114-2 bzw. 116 mit dem Progesteron-Rezeptor betrachtet werden, um dadurch Schlüsse auf den Mechanismus der differentiellen Genexpression durch Steroidhormon-Rezeptoren ziehen zu können.

Zunächst müssen die vollständigen, Protein codierenden Nukleotidsequenzen mittels PCR und Filterhybridisierungen von cDNA-Bänken isoliert werden, um im Anschluß daran die Eigenschaften der neu isolierten Proteine charakterisieren zu können. Zusätzliche Methoden sollen das Ergebnis einer Interaktion von 114-2 bzw. 116 mit dem Progesteron-Rezeptor im Hefe-„two-hybrid“-System erhärten. Zudem sollen die Interaktionsoberflächen sowohl des Progesteron-Rezeptors auf der einen Seite als auch von 114-2 bzw. 116 auf der anderen Seite stärker eingegrenzt werden. Die Ermittlung der Lokalisierung von 114-2 und 116 auf zellulärer Ebene mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen soll Informationen über eine mögliche Kooperation der beiden putativen Cofaktoren mit dem Progesteron-Rezeptor liefern.

Entscheidend ist letztlich, die Funktion von 114-2 und 116 im Hinblick auf die Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor zu untersuchen. Über die Analyse der translatierten cDNA-Sequenzen im Hinblick auf bekannte Proteinmotive sollen Hinweise auf mögliche Funktionen der Proteine erhalten werden. Durch Immunpräzipitationen sollen mögliche Interaktionen von 114-2 und 116 mit weiteren Proteinen und Faktoren untersucht werden, um festzustellen, ob 114-2 und 116 möglicherweise eine Art Brückenprotein zwischen dem Hormon-Rezeptor und anderen, die Transkription aktivierenden Proteinen darstellen. Durch die Konstruktion rekombinanter Proteine soll die Funktion des Progesteron-Rezeptors bzw. des Cofaktors spezifisch blockiert und die daraus resultierenden Veränderungen in Bezug auf die Funktion untersucht werden. Die Aktivierung eines Progesteron-Rezeptor responsiblen Reportergens in transienten Transfektionen soll Aufschluß über den Einfluß von 114-2 bzw. 116 auf die hormonabhängige Aktivierung der Transkription geben. Sowohl ein positiver wie auch ein negativer Effekt würde einen bedeutenden Hinweis auf eine Beteiligung als Cofaktor der Steroidhormon-Rezeptor Transaktivierung geben.

MATERIALIEN UND METHODEN

Molekularbiologische Standardtechniken zur Modifikation und Rekombination von DNA sowie zur Detektion und Isolierung von cDNA-Sequenzen aus Lambda-Phagen-Bänken mittels Filterhybridisierungen und dazu notwendige Lösungen und Rezepte wurden entweder bekannten Methodensammlungen (Sambrook et al., 1989, Ausubel et al., 1991) oder unverändert der zitierten Literatur entnommen und werden im weiteren nicht beschrieben.

1 Chemikalien und Enzyme

Eingesetzt wurden Chemikalien und Enzyme folgender Bezugsquellen: Amersham Pharmacia (Freiburg), BioRad (München), Biozym (Hameln), Roche (Mannheim), Difco Laboratories (Detroit, USA), Eurogentec (Seraing, Belgien), Fluka (Neu-Ulm), GeneCraft (Münster), Gibco BRL (Eggenstein), Invitrogen (Leek, Niederlande), MBI Fermentas (Vilnius, Litauen), Merck (Darmstadt), Pierce (Oud Beijerland, Niederlande), Promega (Madison, USA), Roth (Karlsruhe), Serva (Heidelberg), Sigma (München) und Stratagene (La Jolla, USA).

2 Bakterien und Bakterienkultur

Für die Amplifizierung rekombinanter DNA wurde der Bakterienstamm *E. coli* RRI (F^- , hsd20 (r_B^- , m_B^-), supE44, ara 14, gal-2, lac Y1, pro A2, rec A⁺) und $\text{inv}\alpha F'$ (Clontech) verwendet. Für die Expression von Fusionsproteinen wurden die *E. coli* Stämme RRI und BL21 DE3 pLysS (CM^f) verwendet. Die Anzucht der Bakterien erfolgte auf LB-Agar bzw. in LB-Medium unter Zugabe des für die Selektion benötigten Antibiotikums (Ampicillin, Kanamycin, Zeocin).

2.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation einer Suspension von 40 μl elektrokompetenter *E. coli* RRI erfolgte nach Mischen mit 1 μl Ligationsansatz bzw. Plasmid-DNA durch Elektroporation in vorgekühlten 1 mm Küvetten mit 1,5 kV, 25 mA, 50 μF , 150 Ω . Im Anschluß an den Strompuls wurden die Bakterien in 1 ml SOCoder LB-Medium für 15 - 60 min bei 37°C inkubiert und auf Selektivmedien ausplattiert.

Für die Transformation von BL21 DE3 pLysS wurden 100 μl Calcium kompetenter Zellsuspension mit 100 ng Plasmid-DNA gemischt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte ein Hitzeschock für 30 s bei 42°C, 2 min Inkubation auf Eis und die Zugabe von

400 μl LB-Medium. Nach 15 - 60 min Inkubation bei 37°C wurden 200 μl auf Selektivmedium ausplattiert.

Die Transformation von *E. coli* $\text{inv}\alpha F'$ wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.2 Präparation von Plasmid-DNA

Die Präparation von Plasmid-DNA in kleinem Maßstab aus 2 ml Bakterienkulturen erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) wie von Ausubel et al. 1991 beschrieben.

Die Gewinnung von Plasmid-DNA in größerem Maßstab (30 - 250 ml Bakterienkultur) wurde mit Hilfe von Affinitätssäulen (Tip100 und Tip500, QIAGEN) nach Herstellerangaben durchgeführt.

2.3 Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli*

Für die Expression von GST-Fusionsproteinen in *E. coli* wurden die Stämme RRI oder BL21 DE3 pLys mit dem entsprechenden Expressionsplasmid transformiert. Ausgehend von einer einzelnen Kolonie wurde eine Kultur bei 37°C zunächst in 5 ml LB-Medium mit 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin über Nacht und folgend in 50000 ml bis zu einer OD_{600} von 0,6 - 1,0 aufgezogen. Die Induktion der rekombinanten Proteine erfolgte 2 Stunden bei 30°C mit 0,1 mM IPTG. Nach Ernte durch Zentrifugation wurden die Bakterien in 520 ml NETN-Puffer resuspendiert, die Suspension mit Proteaseinhibitoren (PMSF, Benzamidin, Leupeptin), mit DTT zu 5mM und mit Lysozym zu 1mg/ml versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch Sonifizierung für 1 min. Durch Zentrifugation (12000 g, 15 min) wurde unlösliches Material sedimentiert und der Überstand für 1 Stunde bei 4°C mit äquilibrierter Glutathion-Sepharose 4B (Pharmacia, 100– 500 μl der ursprünglichen Suspension) inkubiert. Nach Sedimentation der Sepharose (2 min, 1000 g) folgten zwei Waschschrte mit 5- 20 ml NETN-Puffer und drei weitere mit 5 - 20 ml NET-Puffer. Für GST-Fusionsprotein Interaktionsanalysen wurde die Sepharose zu ihrem

ursprünglichen Volumen mit NETPuffer äquilibriert, in Trockeneis schockgefroren und bei -20°C für kürzere, bei -74°C für längere Zeit gelagert.

Die Elution der Proteine erfolgte durch dreimalige Inkubation der Sepharose mit 1 ml Glutathion-Elutionspuffer für 10 min.

NET-Puffer: 20 mM Tris/HCl pH 8
100 mM NaCl
1 mM EDTA

NETN-Puffer: NET-Puffer + 0,5% NP40

Glutathion-Elutionspuffer: 50 mM Tris/HCl pH 8
10 mM reduziertes Glutathion

3 Zelllinien und Zellkultur

Für die Analysen wurden folgende Zelllinien eingesetzt: HeLa (humane Cervix Carcinomzellen), HeLa3B2 (stabil mit PR_B transfizierte HeLa-Zellen, s. Kahmann et al. 1998), COS7 (Affennierentumorzellen), MCF7 (humane Brustcarcinomzellen), T47D (humane Brustcarcinomzellen) und RCC1 (humane Nierencarcinomzellen). Für T47D Zellen wurde RPMI-Medium mit 10% Hitze inaktiviertem, fötalem Kälberserum (FCS, Gibco BRL), 100 units/ml Penicillin/Streptomycin, 1mM Glutamin und Insulin verwendet. Die übrigen Zelllinien wurden in Dulbecco's modifiziertem Eagles Medium (DMEM) mit 10% FCS, 100 units/ml Penicillin/Streptomycin und 1mM Glutamin kultiviert.

Die Inkubation der Zellen erfolgte bei 37°C, 7- 7,8 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit.

3.1 Transiente Transfektionen

Transiente Transfektionen dienen der Expression von Proteinen für Reportergen oder Western-Analysen. Für die Transfektion wurden 3-5x10⁵ Zellen in 1,5 cm Zellkulturschalen ausgesät und am folgenden Tag transfiziert. Die Transfektion von 2 µg Plasmid-DNA mit den Liposomen Lipofectin (GibcoBRL, Eggenstein) und DAC30 (Eurogentec) erfolgte nach den jeweiligen Herstellerangaben.

Für die Transfektion mit DEAE-Dextran wurden die Zellen zuvor einmal mit 1 ml PBS und einmal mit 1ml TBS gewaschen. Anschließend erfolgte die Zugabe von 1 ml der Lösung von 0,4- 1,5 µg DNA mit 0,375 - 0,5 mg/ml DEAE-Dextran in TBS und 30 min Inkubation bei 37°C inkubiert. Nach Entfernen der DNA-Lösung wurden die Zellen mit 1 ml Nährmedium + 20% DMSO für 2 min inkubiert und wieder mit 1 ml PBS gewaschen. T47D Zellen wurden vor der Ernte 24 - 48 Stunden in Nährmedium kultiviert, während andere Zelllinien (HeLa, HeLa3B2, RCC1) zunächst noch für 5 Stunden mit 100 µM Chloroquine im Nährmedium behandelt wurden.

Eine Hormonbehandlung der Zellen erfolgte durch Zugabe eines hundertstel Volumens der Nährflüssigkeit des entsprechenden, in 10% Ethanol gelösten Hormons oder nur mit 10% Ethanol als Kontrolle für die angegebenen Zeiten.

3.2 Präparation von Ganzzelextrakten

Für die Präparation von Ganzzelextrakten wurden Zellen einer 1,5 cm Zellkulturschale zweimal mit 3 ml PBS gewaschen und anschließend in 1 ml PBS vom Boden der Zellkulturschale abgeschabt. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 5 min, 2000 Upm) wurde das Zellpellet in 50-100 µl Extraktionspuffer resuspendiert und dreifach in Trockeneis eingefroren und in Eiswasser aufgetaut. Nach Sedimentation der festen Bestandteile (13.000 Upm, 10 min) wurde der Überstand abgenommen und in Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -20 oder -74°C.

Extraktionspuffer: 10% Glycerin
20 mM HEPES/KOH pH 7,9
1 mM EDTA
60 mM NaCl
1 mM DTT
100 µg/ml PMSF

1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Benzamidin

3.3 *in vivo* Proteinmarkierung

Für die *in vivo* Proteinmarkierung wurden am Vortag 1×10^6 HeLa- bzw. HeLa3B2-Zellen in 1,5 cm Zellkulturschalen ausgesät. Die Zellen wurden zweimal mit DMEM ohne Supplemente (ohne FCS, Inositol, Phosphat, Leucin, Cystein, Glutamin und Methionin) gewaschen und darin für 30-45 min inkubiert. Anschließend wurde DMEM ohne FCS und ohne Methionin zugegeben und mit $160 \mu\text{Ci}^{35}\text{S}$ -Methionin (in vivo labeling grade, Amersham) und gegebenenfalls Hormon versetzt. Es folgte eine Inkubation für 5 Stunden bei 37°C . Nach Entfernen des Mediums wurde zweimal mit PBS gewaschen und die Zellen in PBS abgeschabt. Die Lyse der sedimentierten Zellen (Tischzentrifuge, 2000 Upm, 5 min) erfolgte durch starkes Durchmischen in $50 \mu\text{l}$ Single-Det-Lysis-Puffer. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 13.000 Upm, 10 min) wurden die Extrakte in Trockeneis gefroren und bei 74°C gelagert.

Single-Det-Lysis-Puffer: 50mM Tris/HCl pH 8
150 mM NaCl
1% NP40
100 µg/ml PMSF
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Benzamidin

4 in vitro Transkription/Translation im Reticulocyten-Lysat

Die *in vitro* Transkription/Translation im ReticulocytenLysat diente der Darstellung sowohl ³⁵S-markierter wie nicht markierter rekombinanter Proteine. Verwendet wurde das TNT™ Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate System (Promega, Madison, USA) nach Herstellerangaben.

5 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung von Proteinkonzentrationen erfolgte photometrisch nach der Methode von (Bradford, 1976) mit dem Protein-Assay-System (Bio-Rad, München) nach Herstellerangaben.

6 Gelelektrophorese

6.1 Native Agarosegelelektrophorese

Die Trennung doppelsträngiger Nukleinsäuren und ihrer Fragmente wurde in 0,82% Agarosegelen durchgeführt. Die Trennung erfolgte mit einer Spannung von 80- 150 V in horizontalen Kammern mit TAE als Laufpuffer. Zur Detektion der Nukleinsäuren enthielt das Gel 0,5 µg/ml Ethidiumbromid.

6.2 Denaturierende Formaldehyd-Agarosegelelektrophorese

Eine Trennung denaturierter Ribonukleinsäuren wurde in 0,8% Agarosegelen mit 0,67 M Formaldehyd in horizontalen Gelkammern erzielt. Zur Denaturierung der RNA wurden die Proben in 20 µl RNA-Probenpuffer 5 min auf 95°C erhitzt und sofort auf Eis abgekühlt. Die Elektrophorese erfolgte mit 1xMOPS als Laufpuffer bei 150 V, bis die Farbstoffbande etwa zwei Drittel des Gels durchwandert hatte. Zur Inaktivierung von RNasen wurden alle Glasgeräte zuvor über Nacht bei 180°C gebacken und alle hitzeunbeständigen Geräte mit 1%iger SDS-Lösung mehrere Stunden gespült.

RNA-Probenpuffer: 50% Formamid
2,2 M Formaldehyd

5% Glycerin
0,125% Bromphenolblau

6.3 Native Polyacrylamidgelelektrophorese

Zur Trennung kleiner, doppelsträngiger Nukleinsäurefragmente oder nativer DNA/Proteinkomplexe aus Gelretardationsanalysen wurden 4-10% Polyacrylamidgele verwendet. Die Elektrophorese erfolgte in vertikalen Kammern mit TEB als Laufpuffer bei 70- 200 V. Getrennte Nukleinsäuren wurden anschließend mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid in TEB 10 bis 30 min gefärbt.

6.4 Denaturierende Polyacrylamidgelelektrophorese

Einzelsträngige, radioaktiv markierte Ribonukleinsäuremoleküle wurden in 6% Polyacrylamid-/ 8 M Harnstoffgelen in TEB mit einer Spannung von 1,2- 1,5 kV getrennt. Im Anschluß an die Elektrophorese wurde das Gel mit 20% Methanol / 10% Essigsäure fixiert und im Membranpumpenvakuum bei 80°C getrocknet. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500.

6.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Trennung denaturierter Proteine erfolgte in diskontinuierlichen Gele (Laemmli, 1970). Der Gehalt an Acrylamid betrug zwischen 4 und 15%.

Die getrennten Proteine wurden zum einen mit CoomassieBlau nach Ausubel et al. gefärbt, zum anderen wurden spezifische Proteine in Western-Analysen nachgewiesen und radioaktive Proteine mittels Autoradiographie bzw. Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500 detektiert. Die Größe der Proteine wurde anhand geeigneter Molekulargewichtsstandards bestimmt.

7 Detektion von Nukleinsäuren

7.1 Northern-Analysen

Zur Detektion und Größenbestimmung spezifischer Sequenzen einzelsträngiger, gesamtzellulärer RNA bzw. polyA⁺-RNA durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde ein denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel zweimal 20 min mit 10x SSC gewaschen. In einer Pressure-Blot Apparatur (Stratagene, La Jolla, USA) wurden die getrennten Ribonukleinsäuren nach Herstellerangaben über Nacht bei Raumtemperatur auf eine Nylon-Membran (Hybond N, Amersham-Pharmacia, Freiburg) transferiert und mit Hilfe eines UV Crosslinkers (Stratagene, La Jolla, USA) mit 120 mJ/cm² auf der Membran fixiert. Nach zweimaligem Waschen in 2xSSC wurde die Membran zur Sättigung unspezifischer Bindungsstellen 2,5 Stunden bei 65°C mit SDS-Hybridisierungslösung vorhybridisiert. Die Hybridisierung mit spezifischen Sonden erfolgte über Nacht bei 65°C. Folgend wurde die Membran bei 68°C einmal mit 2x SSC; 0,2% SDS und einmal mit 0,1x SSC; 0,1% SDS je 30 min gewaschen. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500.

10xMOPS: 200 mM MOPS
50 mM Natriumacetat
10 mM EDTA
auf pH 7,0 eingestellt

7.2 Southern-Analysen

Für den Nachweis von spezifischen Sequenzen und der Größenbestimmung der sie enthaltenden DNA-Fragmente durch Hybridisierung mit einer radioaktiv markierten DNA-Sonde wurde ein natives Agarosegel im Anschluß an die Elektrophorese jeweils 15-30 min zunächst mit 125 mM HCl, dann mit Denaturierungspuffer und Neutralisierungslösung, abschließend mit Wasser gespült. In einer Kapillarblotvorrichtung (Sambrook et al., 1989)

wurden die Nukleinsäuren mit 10xSSC über Nacht auf eine Nylon Membran (Hybond N, Amersham-Pharmacia, Freiburg) transferiert und mit 120 mJ/cm² mittels eines UV-Crosslinkers (Stratagene, La Jolla, USA) fixiert. Die weiteren Schritte (Prähybridisierung, Hybridisierung, Detektion der Signale) entsprachen der Durchführung der Northern-Analyse.

7.3 RNase Protektionsanalysen

RNase Protektionsanalysen dientem dem exakten Nachweis spezifischer Sequenzen in RNA-Proben mit Hilfe einer *in vitro* markierten, komplementären RNA-Sonde.

Die Darstellung der komplementären RNA erfolgte mit Hilfe von 16 units der T3 bzw. T7-RNA-Polymerase (Roche Mannheim) durch 45 min Inkubation von 0,8 µg linearisierter Plasmid-DNA in 15 µl RNA-Synthese-Mix bei 37°C. Anschließend wurde die DNA durch Zugabe von 35 µl DNase Mix 45 min bei 30°C verdaut. Die neusynthetisierten RNAs wurden mit Spin-Affinitätssäulen (Roche Mannheim; QIAGEN, Hilden) gereinigt, mit Ethanol aus 2,5-3 M Ammoniumacetat gefällt und in 100 µl FA-Hybridisierungslösung aufgenommen. In 30 µl FA-Hybridisierungslösung wurden 20 µg der RNA-Sonde mit 500.000 cpm der RNA-Sonde 10 min bei 85°C denaturiert und über Nacht bei 40°C hybridisiert. Einzelsträngige Bereiche wurden mit 370 µl RNase-Verdau-Puffer 30 min bei 30°C entfernt, die RNasen anschließend durch Zugabe von 4 µl 20% SDS und 3 µl 20 mg/ml Proteinase K 30 min bei 37°C inaktiviert. Nach Extraktion der Proteine durch Phenol/Chloroform und Ethanolfällung der RNAs mit 10 µg HefetRNA als Fällungshilfe folgte eine Denaturierung der Proben bei 95°C für 5 min in 3-4 µl FA-Probenpuffer und die Trennung in einem 6% denaturierendem Polyacrylamidgel. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500 (Fuji).

<i>RNA-Synthese-Mix:</i>	1x Polymerase-Puffer (Roche Mannheim) 5 mM DTT 40 units RNase-Out (GibcoBRL) je 0,5 mM ATP,CTP,GTP 15 µM UTP 20 mCi/ml α- ³² P-UTP (800 Ci/mmol)
<i>DNase Mix:</i>	1x Polymerase-Puffer (Roche Mannheim) 5 mM DTT 40 units RNase-Out (Gibco BRL) 20 units DNase I (RNase frei; Roche Mannheim)
<i>FA-Hybridisierungslösung:</i>	80% Formamid 40 mM PIPES pH 6,4 400 mM NaCl 1 mM EDTA
<i>FA-Probenpuffer:</i>	90% (v/v) Formamid 0,125% Xylencyanol 0,125% Bromphenolblau in TEB

8 Reverse Transkription und Polymerase-Kettenreaktion

Für die Reverse Transkription wurden 3 pmol des Erststrang-Primers mit etwa 2 µg Gesamt- oder poly A⁺-RNA in 10 µl 1x RT-Puffer (Roche Mannheim) 5 min auf 65°C erhitzt. Anschließend wurden 10 µl 1x RT-Puffer mit 20 mM Na₂P₂O₇, 1 mM dNTPs, 0,5 µg/µl BSA und 10 - 15 units AMV-Reverser Transkriptase (Roche Mannheim) zugegeben und 60 min bei 42°C inkubiert. Das Enzym wurde 10 min bei 65°C inaktiviert.

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) wurde in programmierbaren Heizblöcken der Firma Perkin Elmer (Cetus, GeneAmp 2000) durchgeführt. Ein Reaktionsansatz enthielt in 50-100 µl PCR-Puffer je 5 - 50 pmol der spezifischen Primer, 0,2 mM dNTPs, ca. 1 ng DNA und 0,3 - 5 units Taq-Polymerase. Ein Reaktionszyklus begann nach einer einmaligen Denaturierung für 2 - 5 min bei 94 - 95°C mit 30 s, 94 - 95°C, anschließend 30 s, 50 - 60°C („annealing“) und 30 s bis 5 min bei 68 - 72°C. Es wurden 15 bis 35 Zyklen durchlaufen. Abschließend erfolgte eine

Inkubation für 7 - 10 min bei 72°C. Der PCR-Puffer entsprach in der Zusammensetzung den Angaben des Herstellers der jeweiligen Taq-Polymerase (GeneCraft, GibcoBRL, Perkin Elmer, AGS).

Gekoppelte Reverse Transkription mit Polymerase-Kettenreaktion wurde mit Hilfe des TitanOne-Tube-RT-PCR-Kits (Roche Mannheim) nach Herstellerangaben durchgeführt.

9 *Primer Extensionsanalyse*

Durch 10 units T4-Polynukleotidkinase wurden 25 pmol Oligodesoxyribonukleotid in 10 µl Kinasepuffer (Roche Mannheim) mit 20 µCi ^{32}P -ATP eine Stunde bei 37°C phosphoryliert. Anschließend erfolgte 3 min die Inaktivierung der Kinase bei 95°C. Überschüssiges ATP wurde durch dreimalige Ethanolfällung aus 2 M Ammoniumacetat entfernt. Das markierte Oligonukleotid wurde in 100 µl 0,3 M Natriumacetat aufgenommen. Für die Hybridisierung wurden zunächst 10 µg HeLa-polyA⁺-RNA (Kontrolle: 10 µg Hefe-tRNA) mit 5 µl des markierten Oligonukleotids versetzt und zusammen aus 0,3 M Natriumacetat mit 2,5 Volumen Ethanol 30 min auf Trockeneis gefällt. Nach 15 min Zentrifugation (Tischzentrifuge, 14000 rpm) wurde das Sediment getrocknet und in 30 µl Hybridisierungspuffer gelöst. Die Hybridisierung erfolgte bei 30°C über Nacht. Der Hybridisierungsansatz wurde mit 0,3 M Natriumacetat auf 200 µl aufgefüllt und mit 500 µl Ethanol 30 min auf Trockeneis gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 12,5 µl RT-Reaktions-Mix aufgenommen. Die cDNA-Synthese erfolgte nach Zugabe von 50 units AMV Reverser Transkriptase (Roche Mannheim) bei 42°C für 90 min in insgesamt 25 µl. Gestoppt wurde die Reaktion durch Zugabe von 2,5 µl 0,2 M EDTA-Lösung und 1 µg RNase A, gefolgt von 30 min Inkubation bei 37°C. Der Ansatz wurde mit 35 µl 7,5 M Ammoniumacetat aufgefüllt, mit Phenol/Chloroform extrahiert und mit Ethanol 30 min auf Trockeneis gefällt. Nach Zentrifugation wurde das Sediment abermals mit 75 % Ethanol gewaschen, getrocknet und in 3 µl TE aufgenommen. Nach Zugabe von 4 µl FA-Probenpuffer und Denaturierung bei 95°C erfolgte die Trennung der Produkte in einem 6 % Polyacrylamid/8 M Harnstoffgel. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500 (Fuji).

Hybridisierungspuffer: 60% (v/v) Formamid
40mM PIPES pH 6,4
400 mM NaCl
1 mM EDTA

RT-Reaktions-Mix: 2x RT-Puffer (Roche Mannheim)
je 0,5 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
2 units/µl RNase Inhibitor (Roche Mannheim)

FA-Probenpuffer: 90% (v/v) Formamid
0,125% Xylencyanol
0,125% Bromphenolblau
in TEB

10 *GST-Fusionsprotein Interaktionsanalyse*

Je Ansatz wurden 50 µl Glutathion-Sepharose Suspension mit bakteriell exprimierten, gekoppeltem Fusionsprotein zweifach mit je 500 µl frisch angesetzttem PIPuffer gewaschen und anschließend in 1 ml PIPuffer mit 5 µl eines *in vitro* Transkription/Translationsansatzes

1 bis 2 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 1 min, 2000 Upm) wurde das Sediment fünfmal mit je 500 µl PIPuffer gewaschen, wobei einmal das Reaktionsgefäß gewechselt worden ist. Anschließend wurde die Probe mit 20-50 µl 2x SDS-Probenpuffer für 2-5 min auf 95°C erhitzt und in einer SDS-PAGE analysiert. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition und Scan einer Bildplatte des BioImagers BAS1500.

PI-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
150 mM NaCl; 0,2% (v/v) NP40
2,5 mM MgCl₂

1,8 µg/µl BSA
100 µg/ml PMSF
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Benzamidin
0,1 mM EDTA
1 mM DTT

11 Immunchemische Methoden

11.1 Affinitätsreinigung von polyklonalen Antikörpern

Die Generierung polyklonaler Antiseren erfolgte durch Immunisierung von Kaninchen mit bakteriell oder Baculovirus exprimierten Proteinen von den Firmen Eurogentec (Seraing, Belgien) und BioScience (Göttingen).

11.1.1 Beseitigung von Kreuzreaktivitäten

Kreuzreaktionen des Antiserums wurden durch Inkubation mit dem immobilisierten, kreuzreagierenden Protein (hauptsächlich GST) entfernt.

Eine 9 cm² große Nitrocellulose Membran wurde zunächst mit 1 ml PBS angefeuchtet, bevor für 1 Stunde bei 4°C die Adsorption von 100 µg Protein erfolgte. Nach Dekantieren des Überstandes wurde die Membran mit 2 ml 1% Blocking-Reagenz (Roche Mannheim) für eine weitere Stunde bei 4°C gesättigt. Nach kurzem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation der Membran mit 200 µl des Antiserums in 2 ml 1% Blocking-Reagenz bei 4°C über Nacht. Der Überstand wurde dekantiert und für die Affinitätsreinigung eingesetzt.

11.1.2 Affinitätsreinigung

Für die Affinitätsreinigung eines Antiserums wurden die spezifischen Antikörper an das immobilisierte Antigen adsorbiert und nach Entfernung der ungebundenen, unspezifischen Bestandteile eluiert.

Entsprechend der Beseitigung von Kreuzreaktivitäten wurde das Antigen auf eine Nitrocellulose Membran transferiert und die unspezifischen Bindungsstellen gesättigt. Mit dem vorgereinigten Serum wurde die Membran über Nacht bei 4°C inkubiert und anschließend mehrfach intensiv mit mindestens je 5 ml PBS gewaschen. Die Gewinnung der spezifischen Antikörper erfolgte durch zweimalige Elution mit je 500 µl AK-Elutionspuffer für 1 min auf dem Reagenzglasröhrchen und sofortiger Neutralisierung mit 125 µl 1 M Tris/HCl pH 7,9.

AK-Elutionspuffer: 0,2 M Glycin pH 2,5
 150 mM NaCl
 0,1% BSA

11.2 Western-Analysen

Für den Nachweis und zur Größenbestimmung von denaturierten Proteinen in Extrakten aus Zelllinien oder Geweben mit Hilfe spezifischer Antikörper wurden die Proteine einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese mit Transferpuffer in einer Trans-Blot SD-Transferkammer (Bio-Rad, München) mit 2 mA/cm² für eine Stunde auf Nitrocellulose übertragen. Anschließend wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran nach kurzem Waschen in PBS mit 1% Blocking Reagenz (Roche, Mannheim) für eine Stunde bei RT gesättigt, bevor eine Inkubation bei 4°C über Nacht mit dem spezifischen Antikörper in geeigneter Verdünnung (1:4 bis 1:5000) in 1% Blocking Reagenz erfolgte. Nach kurzem Waschen der Membran mit PBS erfolgte eine Inkubation bei RT mit dem geeigneten Sekundärantikörper-Peroxidase-Konjugat in PBS (1:5000 bis 1: 100.000). Die Membran wurde intensiv vier- bis fünfmal mit PBS gewaschen. Der Nachweis der Proteine erfolgte mit den Chemilumineszenzsubstraten der Firmen Amersham (ECL) oder Pierce (SuperSignal Ultra) nach Herstellerangaben.

11.3 Immunfluoreszenzanalysen

Für die Immunfluoreszenzanalyse wurde in Zelllinien entweder das endogene Protein mittels affinitätsgereinigtem polyklonalen Antikörper oder transient exprimiertes Protein mittels monoklonalem Antikörper markiert und mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (Cy3, FITC) gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

Deckgläser für die Mikroskopie wurden für 2-4h in 20% EtOH, 3% Essigsäure geätzt und anschließend hitzesterilisiert. Auf die geätzten Deckgläser wurden etwa 4×10^6 Zellen (HeLa, HeLa3B2, cos7) in 1,5 cm Zellkulturschalen ausgesät und zum Anheften über Nacht im entsprechenden Medium inkubiert. Entweder wurden die Zellen zunächst transfiziert oder direkt nach einer Hormonbehandlung mit 500 µl kaltem Methanol/Aceton Gemisch (1:1) für 5 min fixiert. Es folgten zwei Waschschritte mit je 500 µl PBS für 5 min, sowie die Sättigung unspezifischer Bindungsstellen mit 0,5 % BSA in PBS für 10 min bei 37°C. Pro Deckglas wurden 25 µl des affinitätsgereinigten polyklonalen Antikörpers bzw. des monoklonalen Antikörpers anti-*myc* 9E10 (1:4 mit PBS + 0,5 % BSA verdünnt) aufgegeben. Nach 90 min Inkubation bei 37°C folgten drei Waschschritte mit je 500 µl PBS + 0,5% BSA für 10 min. Anschließend wurden die Deckgläser mit je 25 µl des Fluoreszenzfarbstoff (FITC,CY3) konjugiertem, dem Erstantikörper entsprechenden Sekundäntikörper benetzt und weitere 45 min bei 37°C inkubiert. Es folgten drei weitere Waschschritten mit je 500 µl PBS + 0,5% BSA für 10 min, bevor die Präparate mit Aquamount konserviert wurden. Die Lokalisation erfolgte mit Hilfe eines Fluoreszenz-Mikroskops (Zeiss Axiophot).

11.4 Immunpräzipitationen

In 1,5 ml PI-Puffer wurde der gewünschte epitopgereinigte Antikörper an 40 µl äquilibrierte Protein A Agarose-Suspension (Roche Mannheim) eine Stunde bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 1000 rpm, 1 min) wurde der Überstand vorsichtig entfernt. Das Sediment aus gekoppeltem Antikörper wurde in 0,5 - 1,5 ml PI-Puffer resuspendiert.

Zur Vorreinigung wurden 50- 100 µl Zellextrakt einer *in vivo* Markierung mit 20 µl äquilibrierter Protein A Agarose-Suspension eine Stunde bei 4°C inkubiert. Anschließend wurde die Protein A Agarose durch Zentrifugation (Tischzentrifuge, 14000 rpm, 10 min) sedimentiert. Mit dem Überstand wurde die Suspension des gekoppelten Antikörpers in PI-Puffer versetzt. Im Anschluß wurden die Ansätze- gegebenenfalls in Anwesenheit von 10^{-6} M Hormon 12 - 16 Stunden bei 4°C inkubiert. Nach Zentrifugation (Tischzentrifuge, 2000 rpm, 1 min) wurde das Sediment fünfmal mit 500 µl PI-Puffer ohne BSA gegebenenfalls mit 10^{-6} M Hormon gewaschen, wobei einmal das Reaktionsgefäß gewechselt wurde. Anschließend wurde die Probe mit 2050 µl 2x SDS-Probenpuffer für 2-5 min auf 95°C erhitzt und in einer SDS-PAGE analysiert. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition und Scan einer Bildplatte des BioImagers BAS1500.

PI-Puffer: 10 mM Tris/HCl pH 7,5
150 mM NaCl; 0,2% (v/v) NP40
2,5 mM MgCl₂
1,8 µg/µl BSA
100 µg/ml PMSF
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Benzamidin
0,1 mM EDTA
1 mM DTT

12 Gelretardationsanalysen

Gelretardationsanalysen dienen der Untersuchung der hormonabhängigen DNA-Bindung des Progesteronrezeptors und der Ausbildung ternärer und quarternärer Komplexe mit weiteren Proteinen und spezifischen Antikörpern. Für die Gelretardation wurde ein doppelsträngiges Oligodesoxyribonukleotid, das eine singuläre Bindestelle des Progesteronrezeptors enthielt, entweder mit T4-Polynukleotid-Kinase und γ -³²P-ATP 5'-endmarkiert oder unmarkiert eingesetzt, wenn ³⁵S-markierte Proteine untersucht werden sollten.

Ganzzellextrakte wurden eine Stunde bei 4°C mit 10^{-6} M Hormon behandelt, bevor ein 10 µl Ansatz mit 1,6 µl Ganzzellextrakt, 4,2 µl 2xBS-Mix, 1,6 µl eines Transkriptions/Translationsansatzes, 200 ng poly-dI/dC und 120.000 cpm des markierten oder die entsprechende Menge des unmarkierten Oligonukleotids für eine Stunde bei 4°C inkubiert wurde. Die Trennung der entstandenen Komplexe erfolgte in nativen 4% Polyacrylamidgelen, die im Anschluß an die Elektrophorese mit 20% Methanol/ 10% Essigsäure fixiert wurden. Die Detektion der Signale erfolgte durch Autoradiographie oder Exposition einer Bildplatte des BioImagers BAS1500.

2xBS-Mix: 50 mM HEPES/KOH pH 7,9
0,2 mM EGTA
2 mM MgCl₂

2mM DTT;
10% Glycerin
5% Ficoll

ERGEBNISSE

1 Vorarbeiten

Viele Schritte bei der Regulation der differentiellen Genexpression sind unverstanden. Das Wissen um die Funktionen von Cofaktoren und Mediatorkomplexen hat in letzter Zeit zwar stark zugenommen, zur Vervollständigung des Bildes fehlen dennoch entscheidende Komponenten.

Zur Identifizierung von Proteinen, die mit dem Progesteron-Rezeptor hormonabhängig interagieren und somit gute Kandidaten darstellen, am Mechanismus der transkriptionellen Regulation durch den Progesteron-Rezeptor beteiligt zu sein, wurde eine humane cDNA-Bank mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems durchsucht (Schwerk, 1996).

Da vorausgesetzt wurde, daß Cofaktoren, die an der hormonabhängigen Transaktivierung beteiligt sind, mit der beladenen Ligandenbindungsdomäne interagieren, wurde als Zielprotein die carboxyterminale Hälfte des Progesteron-Rezeptors (AS 456 - 933 und AS 631 - 933) eingesetzt. Auf diesem Weg konnten letztlich zwei cDNA-Sequenzen isoliert werden, welche für Peptide codieren, die im Hefe-„two-hybrid“-System eindeutig allein agonistabhängig mit dem carboxyterminalen Teil des Progesteron-Rezeptors interagieren. Bezeichnet wurden diese Sequenzen auf Grund der Transformantennummern mit 1142 und 116.

Für 114-2 wurde eine Nukleotidsequenz von 1823 bp ermittelt. Diese Sequenz codiert in einem offenen Leserahmen für 599 AS mit einem Molekulargewicht von 68 kDa. Datenbank-Recherchen ergaben keine Übereinstimmung mit bereits bekannten Proteinen, zeigten aber eine Homologie zu einem „Expressed Sequence Tag“ (EST) aus einer humanen Pancreas „Islet“-cDNA-Bank (Takeda et al., 1993). Die Northern-Analyse humaner RNAs unterschiedlicher Gewebe zeigte eine differentielle Expression von 1142. Die stärkste Expression wurde in Hoden festgestellt. In diesem Gewebe konnten ein ca. 10 kb großes Haupttranskript und zwei weitere RNAs einer Länge von 9 kb und 7 kb detektiert werden. Demgegenüber ist 114-2 in Lunge, Leber und Niere nicht nachzuweisen. In den übrigen untersuchten Geweben (Milz, Thymus, Prostata, Eierstock, Dünndarm, Dickdarm, Leukozyten, Gehirn, Gebärmutter, Skelettmuskel, Bauchspeicheldrüse) wird nur das 10 kb Haupttranskript vergleichsweise schwach exprimiert. In Herz tritt zusätzlich schwach die 9 kb-Bande auf. Daß 114-2 hauptsächlich in einem reproduktiven Organ, den Hoden, exprimiert wird, wurde als weiterer Hinweis gewertet, daß 114-2 an einer Funktion von Steroidhormon-Rezeptoren beteiligt sein könnte.

Die ermittelte cDNA-Sequenz von 116 besteht aus 1554 Nukleotiden, die in einem offenen Leserahmen 403 AS mit einem Molekulargewicht von ca. 47 kDa codieren. Auf AS 403 folgt ein Stop-Codon. In Datenbank-Recherchen konnten keine Homologien zu bereits bekannten Proteinen entdeckt werden. Es wurden jedoch insgesamt vier Übereinstimmungen mit ESTs gefunden, davon drei ESTs aus normalen humanen Vorhaut-Melanozyten und ein EST aus humanem fötalen Hirn. Die Northern-Analyse zeigte in allen untersuchten, humanen Geweben ein etwa 2 kb großes Transkript. Weitere, schwächere Signale traten bei 3,5 kb und 7 kb auf. Auf Grund der schwachen, nicht ganz eindeutigen Signale wurde vermutet, daß es sich bei 116 um ein seltenes Transkript handelt.

2 Charakterisierung von 114-2

2.1 Isolierung und Analyse der codierenden cDNA-Sequenz

Bisher wurde für 114-2 eine cDNA von 1823 bp beschrieben (Schwerk, 1996). Dabei handelt es sich um ein internes Fragment des vollständigen Transkripts.

Im Rahmen dieser Arbeit ist es gelungen, die Sequenz der cDNA von 1142 sowohl in 5'- als auch in 3'-Richtung zu verlängern (s. Abb. 1). Zunächst wurde die Adenin reiche Sequenz am 3-Terminus der bisher beschriebenen Sequenz überspannt, indem eine HeLa-cDNA-Bank in dem Bakteriophagen Lambda_{gt}11 mittels PCR durchsucht wurde. Eingesetzt wurden dazu ein in der bekannten 1142 Sequenz gelegener Primer und ein Primer gegen das Lambda-Genom. Entsprechend wurde auch eine Bibliothek von cDNA-Bänken unterschiedlicher, humaner Gewebe (Clontech quick screen cDNA library panel) durchmustert. Anschließend wurde die Sequenz in beide Richtungen mittels Filterhybridisierungen einer humanen fötalen Hirn-cDNA-Bank in Lambda_{gt}10-Phagen (Clontech, HL3003a) auf insgesamt 5947 bp (Pos. -166 bis 5781) verlängert. Die cDNA wurde durch Sequenzierung von Subklonen der isolierten Phageninsertionen bzw. PCRAmplifikaten bestimmt. Unsichere Sequenzabschnitte wurden durch RT-PCR auf HeLa poly-A⁺-RNA überlappt und sequenziert.

Flankiert von kurzen 5'- und 3'-untranslatierten Regionen codiert die isolierte Nukleotidsequenz in einem offenen Leserahmen 1746 AS mit einem Molekulargewicht von 194,7 kDa. Sowohl der 5'- als auch der 3'-Terminus der

cDNA wurden durch jeweils einen einzelnen Klon isoliert, so daß sowohl der Translationsstart als auch das Stop Codon nicht ganz sicher festgelegt werden konnten.

CCGGA																				-161			
GCCGGTGC GA GGAGGGCACC CGGTGCGTCC CCGGAGCGGG GAGGCCAGGC CGGGCAACCC TGGGGCCCGGT CGGGGCGGGC																				-81			
TCACTGCACC CTCCGCCAGC TCCGCGGGAT GCACCGTGGT AGCCGAGGGC GGAGGCGACA CTCTCAGGTA AATTGGCAGG																				-1			
ATG	AGG	AGC	AGC	AAA	TCA	AAA	GAG	GTG	CCT	TTA	CCA	AAT	CCA	AGG	AAC	TCT	CAA	AGC	AAG	GAT	ACT	66	
M	R	S	S	K	S	K	E	V	P	L	P	N	P	R	N	S	Q	S	K	D	T	22	
GTT	CAA	GCA	GAT	ATA	ACC	ACA	TCG	TGG	GAT	GCA	CTT	TCT	CAA	ACC	AAG	GCT	QCT	CTG	AGA	CAC	ATT	132	
V	Q	A	D	I	T	T	S	W	D	A	L	S	Q	T	K	A	L	R	H	I		44	
GAA	AAT	AAA	TTA	GAA	GTA	GCC	CCT	ACA	AGT	ACA	GCT	GTG	TGT	GAT	TCT	GTC	ATG	GAT	ACC	AAG	AAG	198	
E	N	K	L	E	V	K	P	T	S	A	T	V	C	D	S	V	M	D	T	K	A	66	
TCT	TCT	ACA	AGT	GCT	ACT	CGA	AAA	ATA	AGT	AGA	AAA	GAT	GGT	AGA	TAC	CTG	GAT	GAT	TCT	TGG	GTT	264	
S	S	T	S	A	T	R	K	I	S	R	K	D	G	R	Y	L	D	D	S	W	V	88	
AAT	GCT	CCA	ATC	TCC	AAA	TCC	ACT	AAA	TCA	CGA	AAA	GAG	AAA	TCT	CGT	AGT	CCT	CTC	AGG	GCC	ACC	330	
N	A	P	I	S	K	A	T	T	S	A	K	E	K	S	R	S	P	L	R	A	T	110	
ACC	CTG	GAG	GGT	AAT	GTG	AAG	AAA	AAT	AAT	CGT	GTG	GAA	TTT	CGT	GAA	CCT	TTG	GTT	TCT	TAT	AGG	396	
T	L	E	G	N	V	K	K	N	N	R	V	E	F	R	E	P	L	V	S	Y	R	132	
GAA	ATC	CAT	GGT	GCA	CCT	TCC	AAT	TTC	AGT	TCC	AGC	CAT	CTG	GAA	TCA	AAG	CAC	GTA	TAC	TGT	GTA	462	
E	I	H	G	A	P	S	N	F	S	S	H	L	E	S	K	H	V	Y	C	V		154	
GAT	GTT	AAT	GAA	GAA	AAG	ACT	GAG	AGC	GGT	AAC	TGG	ATG	ATA	GGC	AGT	CGA	GAA	GAA	CGG	AAT	ATA	528	
D	V	N	E	E	K	T	E	S	G	N	W	M	I	G	S	R	E	E	R	N	I	176	
CGG	AGC	TGT	GAT	TTT	GAG	AGC	TCC	CAA	TCA	TCT	GTC	ATC	AAT	GAT	ACA	GTT	GTT	AGG	TTT	TTA	AAT	594	
R	S	C	D	F	E	S	S	Q	S	S	V	I	N	D	T	V	V	R	F	L	N	198	
GAT	CGA	CCA	GCA	ATT	GAT	GCA	TTG	CAA	AAT	TCT	GAA	TGT	TTG	ATT	AGG	ATG	GGA	GCT	TCT	ATG	AGA	660	
D	R	P	A	I	D	A	L	Q	N	S	E	C	T	I	R	M	A	S	T	M	R	220	
ACT	GAG	GAA	GAA	ATG	CCT	AAC	AGA	ACA	AAA	GGA	AGT	GAG	AAT	AAT	TTG	AAG	CTT	TCT	GTG	AAT	AAC	726	
T	E	E	E	M	P	N	R	T	K	G	S	E	N	N	L	K	L	S	V	N	N	242	
ATG	GCC	CAT	GAT	ACT	GAT	CCA	AAA	GCG	TTA	CGA	CTA	ACT	GAC	TCT	TCT	CCA	TCC	TCT	ACT	AGT	ACT	792	
M	A	H	D	T	T	P	K	A	L	R	L	T	D	S	S	P	S	T	S	T		264	
TCT	AAT	TCC	CAA	AGA	TTA	GAT	ATT	CTA	AAG	CGG	CGA	CAA	CAT	GAT	GTC	AAA	CTG	GAA	AAA	CTT	AAG	858	
S	N	S	Q	R	L	D	I	L	K	R	R	Q	H	D	V	K	L	E	K	L	K	286	
GAA	CGG	ATT	AGA	AAA	CAG	TGG	GAA	CAC	TCA	GAA	GAA	ACA	AAT	GGC	CGG	GGC	ACG	AAG	CTG	GGT	CAT	924	
E	R	I	R	K	Q	W	E	H	S	E	E	T	N	G	R	G	T	K	L	G	H	308	
ATT	GAC	CAT	CCA	GTA	ATG	GTT	GTT	AAT	GTT	GAT	AAC	TCA	GTA	ACA	GCA	AAA	GTC	AGA	AAA	GTG	GCA	990	
I	D	H	P	V	M	V	V	N	V	D	N	S	V	A	A	K	V	A	K	V	A	330	
ACA	GCA	CCA	CCT	GCT	CCA	GCA	TAT	AAA	GGT	TTC	AAC	CCT	TCA	GAG	ACC	AAG	ATT	CGA	ACA	CCT	GAT	1056	
T	A	P	P	A	P	A	Y	K	G	F	N	P	S	E	T	K	I	R	T	P	D	352	
GGG	AAA	GTG	TGG	CAG	GAG	GCT	GAG	TTT	CAA	AAC	ATG	AGT	AGA	GAA	CTG	TAT	CGA	GAT	TTA	GCA	CTT	1122	
G	K	V	W	Q	E	A	E	F	Q	N	M	S	R	E	L	Y	R	D	L	A	L	374	
CAC	TTT	GCA	GAT	GAT	ATT	TCT	ATA	AAG	GAG	AAA	CCT	GCT	GAA	AAA	AGT	AAG	AGA	GAA	AGT	GTT	CAA	1188	
H	F	A	D	D	I	S	I	K	E	K	P	A	E	K	S	K	R	E	S	V	Q	396	
GCC	AGT	ACG	AAA	AGT	CCA	AAA	AGT	AGC	ACA	GTA	TCA	AGT	ACA	GAA	TGC	AGA	ACA	GGT	AGT	AGT	CAT	1254	
A	S	T	K	S	K	S	S	S	T	V	S	S	T	E	C	R	A	G	S	S	H	418	
CTT	ATA	AGT	ACA	TCT	TCT	TGG	CGA	GAT	GGG	CAA	AAA	TTA	GTA	AAG	AAG	ATT	CTG	GGA	CCT	GCT	CCC	1320	
L	I	S	T	S	T	W	R	D	G	Q	K	L	V	K	K	I	L	G	C	P	A	440	
AGA	ATG	GAG	CCA	AAA	GAG	CAA	AGA	ACA	GCA	TCA	AGT	GAC	AGA	GGT	GGA	AGA	AGA	AGA	ACT	GCT	AAA	1386	
R	M	E	P	K	E	Q	R	T	A	S	D	R	G	G	R	R	R	R	T	A	K	462	
TCT	GGG	GGT	CAC	ATT	GGA	AGA	GCA	GAA	TCT	GAT	CCC	AGG	TTG	GAC	GTT	TTA	CAT	AGA	CAT	CTT	CAA	1452	
S	G	G	H	I	G	R	A	E	S	D	P	R	L	D	V	L	H	R	H	L	CAA	484	
AGA	AAC	TCA	GAA	CGT	TCG	AGA	AGT	AAA	TCT	CGG	TCT	GAA	AAT	AAT	ATA	AAG	AAA	CTA	GCT	TCA	TCT	1518	
R	N	S	E	R	S	R	S	K	S	R	S	E	N	N	I	K	K	L	A	S	S	506	
CTT	CCA	GAT	AAT	AAG	CAG	GAG	GAA	AAT	ACT	GCC	TTA	AAT	AAG	GAC	TTT	TTA	CCT	ATT	GAA	ATT	CGT	1584	
L	P	D	N	K	Q	E	N	T	A	L	N	K	D	T	F	L	P	I	E	I	R	528	
GGC	ATT	CTT	GAT	GAC	CTA	CAG	CTG	GAT	TCT	ACA	GCT	CAC	ACT	GCA	AAG	CAA	GAT	ACT	GTA	GAG	TTA	1650	
G	I	L	D	D	L	Q	L	D	S	T	A	H	T	A	K	Q	D	T	V	E	L	550	
CAG	AAC	CAG	AAG	TCA	TCA	GCA	CCA	GTA	CAT	GCT	CCT	AGG	AGT	CAC	AGC	CCA	GTA	AAA	AGA	AAA	CCT	1716	
Q	N	Q	K	S	S	A	P	V	H	A	P	R	S	H	S	P	V	K	R	K	P	572	
GAC	AAA	ATA	ACA	GCT	AAT	GAA	GAT	CCC	CCT	GTT	ATT	TCC	AAA	AGG	CGC	CAC	TAT	GAC	ACA	GAT	GAG	1782	
D	K	I	T	A	N	E	D	P	P	V	I	S	K	R		H	Y	D	T	E		594	
GTA	CGA	CAG	TAC	ATT	GTT	AGG	CAG	CAG	GAG	GAA	AGG	AAG	AGA	AAG	CAA	AAT	GAA	GAG	AAG	AAG	GCT	1848	
V	R	Q	Y	I	V	R	Q	Q	E	E	R	K	R	K		Q	N	E	E	K	A	616	
CAA	AAG	GAG	GCT	ACA	GAA	CAG	AAA	AAC	AAA	CGA	TTA	CAA	GAG	CTC	TAC	CGG	AAG	CAG	AAG	GAA	GCC	1914	
Q	K	E	A	T	E	Q	K	N	K	R	L	Q	E	L	Y	R	K	Q	K	E	A	638	
TTT	ACT	AAA	GTA	AAA	AAT	GTC	CCT	CCT	TCT	GAG	CCA	TCA	GCA	ACT	AGG	CGA	CTA	CAG	GAA	ACT	TAC	1980	
F	T	K	V	K	N	V	P	P	S	E	P	S	A	T	R	R	L	Q	E	T	Y	660	
TCC	AAA	TTG	CTA	CTA	GAA	AAG	ACC	TTG	CTT	GAA	GAG	CCA	TCT	CAT	CAA	CAT	GTT	ACG	CAG	GAA	ACA	2046	
S	K	L	L	L	E	K	T	L	L	E	P	P	S	H	Q	H	V	T	Q	E	T	682	
CAG	GCC	AAA	CCA	GGG	TAT	CAG	CCA	TCT	GGA	GAA	TCT	GAC	AAA	GAA	AAC	AAA	GTA	CAG	GAA	CGT	CCC	2112	
Q	A	K	P	G	Y	Q	P	S	G	E	S	D	K	E	N	K	V	Q	E	R	P	704	
CCA	AGT	GCA	TCT	TCC	AGT	AGT	GAC	ATG	TCT	CTC	TCA	GAA	CCT	CCA	CAG	CCT	CTT	GCA	AGA	AAA	GAC	2178	
P	S	A	S	S	S	D	M	S	L	S	E	P	P	P	Q	P	L	A	R	K	D	726	
TTG	ATG	GAA	TCT	ACA	TGG	ATG	CAG	CCT	GAA	AGA	TTG	AGC	CA	CAA	GTT	V	C	H	CAT	TCT	CAA	CCA	2244
L	M	E	S	T	W	M	Q	P	E	R	L	S	P		V	H	H	S	Q	P	Q	748	
CCT	TTT	GCT	GGA	ACA	GCT	GGA	AGT	TTA	CTC	TCC	CAT	CTC	TTG	AGT	TTA	GAG	CAT	GTA	GGA	ATT	TTG	2310	
P	F	A	G	T	A	G	S	L	L	S	H	L	L	S	L	E	H	V	G	I	L	770	
CAT	AAG	GAT	TTT	GAA	TCT	ATT	TTA	CCA	ACC	AGG	AAG	AAT	CAT	AAT	ATG	GCT	TCA	AGG	CCA	TTA	ACT	2376	
H	K	D	F	E	S	I	L	T	P	R	K	N	H	N	M	A	S	R	P	L	T	792	

TTT	ACA	CCT	CAA	CCA	TAT	GTG	ACC	TCA	CCA	GCT	GCT	TAT	ACA	GAT	GCC	TTG	TTA	AAA	CCT	AGT	GCC	2442
F	T	P	Q	P	Y	V	T	S	P	A	A	Y	T	D	A	L	L	K	P	S	A	814
AGC	CAA	TAT	AAG	AGT	AAA	CTG	GAT	CGT	ATT	GAA	GCC	TTG	AAA	GCA	ACA	GCT	GCT	TCT	TTG	TCC	AGC	2508
S	Q	Y	K	S	K	L	D	R	I	E	A	L	K	A	T	A	A	S	L	S	S	836
AGA	ATT	GAA	AGT	GAA	GCC	AAG	AAA	TTA	GCT	GGG	GCC	AGC	ATT	AAC	TAT	GGG	TCA	GCA	TGG	AAC	ACT	2574
R	I	E	S	E	A	K	K	L	A	G	A	S	I	N	Y	G	S	A	W	N	T	858
GAG	TAT	GAT	GTG	CAG	CAG	GCA	CCT	CAA	GAA	GAT	GGA	CCT	TGG	ACC	AAG	GCT	GTA	ACT	CCA	CCT	GTG	2640
E	Y	D	V	Q	Q	A	P	Q	E	D	G	P	W	T	K	A	V	T	P	P	V	880
AAA	GAT	GAT	AAT	GAA	GAT	GTT	TTC	TCT	GCC	AGA	ATT	CAG	AAG	ATG	CTG	GGA	AGC	TGT	GTA	TCT	CAT	2706
K	D	D	N	E	D	V	F	S	A	R	I	Q	K	M	L	G	S	C	V	S	H	902
GCA	ACT	TTT	GAT	GAT	GAT	CTT	CCT	GGT	GTA	GGC	AAT	CTT	AGT	GAA	TTT	AAA	AAG	CTT	CCT	GAG	ATG	2772
A	T	F	D	D	D	L	P	G	V	G	N	L	S	E	F	K	K	L	P	E	M	924
ATA	AGA	CCA	CAG	AGT	GCC	ATA	TCA	AGC	TTT	AGA	GTG	AGA	TCC	CCT	GGT	CCC	AAA	CCA	CAA	GGG	CTA	2838
I	R	P	Q	S	A	I	S	S	F	R	V	R	S	P	G	P	P	P	Q	G	L	946
CTG	GCA	CAG	TTA	TGT	AAA	AGG	CAG	ACT	GAC	TCT	TCT	AGC	TCT	GAT	ATG	CAA	GCC	TGT	TCT	CAA	GAC	2904
L	A	Q	L	C	K	R	Q	T	D	S	S	S	S	D	M	Q	A	C	S	Q	D	968
AAA	GCC	AAA	ATA	TCT	CTT	GGT	TCC	AGC	ATA	GAT	TCA	GTC	AGT	GAA	GGG	CCT	CTT	CTT	AGT	GAG	GGG	2970
K	A	K	I	L	L	G	S	S	I	D	S	V	S	E	G	P	L	L	S	E	G	990
AGT	CTC	TCT	GAA	GAA	GAG	GGA	GAC	CAG	GAT	GGA	CAG	CCC	CTT	TTG	AAA	GTA	GCA	GAA	ATT	TTA	AAA	3036
S	L	S	E	E	E	G	D	Q	D	G	Q	P	L	L	K	V	A	E	I	L	K	1012
GAA	AAG	GAA	TTT	TGT	CCT	GGA	GAA	AGA	AAT	AGT	TAT	GAA	CCC	ATC	AAA	GAG	TTT	CAG	AAA	GAA	GCT	3102
E	K	E	F	C	P	G	E	R	N	S	Y	E	P	I	K	E	F	Q	K	E	A	1034
GAA	AAA	TTC	TTG	CCA	CTT	TTT	GGG	CAC	ATA	GGT	GGT	ACA	CAA	AGC	AAA	GGA	CCA	TGG	GAA	GAA	TTG	3168
E	K	F	L	P	L	F	G	H	I	G	G	T	Q	S	K	G	P	W	E	E	L	1056
GCA	AAG	GGA	AGT	CCA	CAT	AGC	GTC	ATT	AAT	ATT	TTT	ACA	AAA	TCC	TAT	CAG	TTA	TAT	GGA	AAA	GGG	3234
A	K	G	S	P	H	S	V	I	N	I	F	T	K	S	Y	Q	L	Y	G	K	G	1078
TTT	GAA	GAC	AAG	TTG	GAC	AGA	GGA	ACA	TCA	ACA	TCA	CGG	CCT	TTG	AAT	GCC	ACC	GCA	ACT	CCT	CTA	3300
F	E	D	K	L	D	R	G	T	S	T	S	R	P	L	N	A	T	A	T	P	L	1100
AGT	GGT	GTT	TCA	TAT	GAA	GAT	GAT	TTT	GTC	TCC	TCT	CCA	GGG	ACT	GGG	ACT	TCG	ACA	GAA	AAA	AAA	3366
S	G	V	S	Y	E	D	D	F	V	S	S	P	G	T	G	T	S	T	A	A	K	1122
TCA	ACT	CTT	GAA	CCT	CAT	AGC	ACT	TTA	AGC	CCT	CAG	GAG	GAC	CAT	TCT	AAC	AGA	AAG	TCT	GCC	TAT	3432
S	T	L	E	P	H	S	T	L	S	P	Q	E	D	H	S	N	R	K	S	A	Y	1144
GAT	CCT	TCC	TCT	GTG	GAT	GTT	ACC	TCC	CAG	CAT	TCA	TCA	GGA	GCC	CAG	TCT	GCT	GCA	TCG	TCT	CGT	3498
D	P	S	S	V	D	V	T	S	Q	H	S	S	G	A	Q	A	A	A	A	S	R	1166
TCA	TCT	ACT	TCT	TCT	AAA	GGA	AAG	AAA	GGA	AAA	AAG	GAA	AAG	ACA	GAA	TGG	TTG	GAT	TCA	TTC	ACT	3564
S	S	T	S	S	K	G	K	K	G	K	K	E	K	T	E	W	L	D	S	F	T	1188
GGA	AAT	GTT	CAG	AAC	TCA	CTT	CTT	GAT	GAG	GAA	AAA	GCA	GAA	CGT	GGC	TCC	CAT	CAA	GGA	AAG	AAA	3630
G	N	V	Q	N	S	L	L	D	E	E	K	A	E	R	G	S	H	Q	G	K	K	1210
TCT	GGG	ACC	AGC	AGC	AAA	CTT	TCT	GTT	AAA	GAT	TTT	GAG	CAG	ACT	CTT	GAT	ACA	GAT	AGC	ACT	TTG	3696
S	G	T	S	S	K	L	S	V	K	D	F	E	Q	T	L	D	T	D	S	T	L	1232
GAG	GAT	CTT	TCT	GGA	CAT	TCT	GTG	AGT	GTC	TCA	TCA	GAT	AAG	GGA	AGA	TCT	CAG	AAA	ACT	CCA	ACT	3762
E	D	L	S	G	H	S	V	S	V	S	S	D	K	G	R	S	Q	K	T	P	T	1254
TCT	CCC	CTG	TCA	CCA	AGT	TCC	CAG	AAA	TCA	TTG	CAG	TTT	GAC	GTT	GCA	GGA	ACT	TCT	TCA	GAA	AGA	3828
S	P	L	S	P	S	S	Q	K	S	L	Q	F	D	V	A	G	T	S	S	E	R	1276
TCT	AAG	TCG	TCA	GTA	ATG	CCT	CCA	ACT	ATA	ACA	GGA	TTT	AAG	CCT	AAT	GCA	CCT	CTC	ACT	GAT	CTG	3894
S	K	S	S	V	M	P	P	T	I	T	G	F	K	P	N	A	P	L	T	D	L	1298
AAC	CCG	GCA	GCC	AGC	AGA	ACA	ACG	ACA	GAG	AAC	ATG	GCT	CCA	ATA	CCA	GGT	TCT	AAG	CGC	TTT	TCT	3960
N	P	A	A	R	T	T	T	T	E	N	M	A	P	I	P	G	S	K	R	F	S	1320
CCT	GCT	AGC	CTC	CAT	CAT	CGT	ATG	GCA	GAA	CTC	AGT	TAT	CTG	AAC	GCC	ATT	GAG	GAG	TCG	GTG	4026	
P	A	G	L	H	H	R	M	A	E	A	S	Y	L	N	A	I	E	E	E	S	V	1342
CGC	CAA	CTG	TCA	GAT	GTA	GAA	AGA	GTT	AGA	GGC	ATT	TCA	CTT	GCT	CAG	CAG	GAG	AGT	GTG	TCT	CTA	4092
R	Q	L	S	D	V	E	R	V	R	G	I	S	L	A	Q	Q	E	S	V	S	L	1364
GCT	CAG	ATA	ATA	AAG	GCA	CAA	CAG	CAA	CGC	CAT	GAA	AGA	GAC	TTG	GCC	CTC	TTG	AAA	CTA	AAG	GCT	4158
A	Q	I	I	K	A	Q	Q	Q	R	H	E	R	D	L	A	L	L	K	L	K	A	1386
GAA	CAA	GAG	GCT	CTG	GAG	AGT	CAG	AGA	CAA	TTA	GAA	GAA	ACC	CGA	AAC	AAA	GCA	GCT	CAG	GTC	CAT	4224
E	Q	E	A	L	E	S	Q	R	Q	L	E	E	T	R	N	K	A	A	Q	V	H	1408
GCA	GAA	TCA	TTA	CAG	CAG	GTG	GTT	CAA	TCA	CAA	CGG	GAA	GTA	ACT	GAA	GTC	CTG	CAG	GAA	GCA	ACG	4290
A	E	S	L	Q	Q	V	V	Q	S	Q	R	E	V	T	E	V	L	Q	E	A	T	1430
TGT	AAA	ATA	GCA	GCT	CAG	CAG	TCA	GAA	ACT	GCT	AGC	CTC	ACC	ACA	GAC	GCA	GCA	CGT	CAA	ATC	TGT	4356
C	K	I	A	A	Q	Q	S	E	T	A	R	L	T	T	D	A	A	R	Q	I	C	1452
GAG	ATG	GCA	GAG	TTG	ACT	AGA	ACT	CAT	ATC	TCA	GAT	GCT	GTC	GTG	GCT	TCA	GGA	GCT	CCC	CTT	GCA	4422
E	M	A	E	L	T	R	T	H	I	S	D	A	V	V	A	S	G	A	P	L	A	1474
ATA	CTG	TAT	GAC	CAC	CAA	CGG	CAG	CAC	CTT	CCA	GAC	TTT	GTG	AAA	CAG	CTG	AGG	ACC	AGA	ACT	GAA	4488
I	L	Y	D	H	Q	R	Q	H	L	P	D	F	V	K	Q	L	R	T	R	T	E	1496
ACA	GAT	AGG	AAA	AGT	CCA	TCT	GTT	TCA	CTC	TCT	CAG	AGT	AAA	GAA	GGG	ACC	CTT	GAC	TCA	AAG	CAT	4554
T	D	R	K	S	P	S	V	S	L	S	Q	S	K	E	G	T	L	D	S	K	H	1518
CAG	AAG	TAT	TCT	GCT	TCA	TAT	GAT	AGT	TAT	TCT	GAG	TCT	TCA	GGA	TAC	AAG	AAT	CAT	GAT	AGA	AGA	4620
Q	K	Y	S	A	S	Y	D	S	Y	S	E	S	S	G	Y	K	N	H	D	R	A	1540
AGT	AGC	AGT	GGT	AGC	AGC	CGC	CAA	GAA	AGT	CCT	TCA	GTT	CCA	TCT	TGT	AAG	GAA	AAT	GAG	AAG	AAA	4686
S	S	S	S	S	S	R	Q	E	S	P	S	V	P	S	C	K	E	N	E	A	K	1562
CTT	AAT	GGT	GAA	AAG	ATA	GAG	AGT	TCC	ATT	GAT	GAA	CAG	GTT	CAG	ACT	GCT	GCA	GAT	GAT	TCT	CTA	4752
L	N	G	E	K	I	E	S	S	I	D	E	Q	V	Q	T	A	A	D	D	S	L	1584
CGA	AGT	GAT	AGT	GTT	CCA	TCT	CTT	CCT	GAT	GAA	AAA	GAC	TCA	ACG	TCT	ATT	GCA	ACA	GAA	TAT	TCT	4818
R	S	D	S	V	P	S	L	P	D	E	K	D	S	T	T	I	A	T	E	Y	S	1606

CTG L	AAA K	TTT F	GAT D	GAA E	TCC S	ATG M	ACA T	GAA E	GAT D	GAA E	ATA I	GAA E	GAA E	CAA Q	TCA S	TTT F	CGA R	TCA S	TTA L	CTA L	CCT P	4884 1628
TCA S	GAG E	AGT S	CAC H	CGC R	AGA R	TTT F	AAC N	ATG M	GAA E	AAG K	AGA R	AGA R	GGT G	CAT H	CAT H	GAT D	AC D	TCT S	GAT D	GAA E	GAA E	4950 1650
GCT A	TCT S	CCA P	GAA A	AAA K	ACT T	ACA T	CTG L	TCT L	ACT T	GCC A	AAG K	GAA E	CTG M	AAC N	ATG M	CCA P	TTC F	TCA S	GGA G	GGA G	CAA Q	5016 1672
GAT D	AGC S	TTT F	TCT S	AAA K	TTT F	ACT T	ATG M	GAG E	ATG M	GTT V	CGA R	CAG Q	TAT Y	ATG M	AAA K	GAG E	GAA E	GAA E	ATG M	AGG R	GCA A	5082 1694
GCT A	CAC H	CAG Q	TCT S	TCA S	CTC L	CTG L	CGT R	CTC L	CGT R	GAA E	AAG K	GCC A	TTG L	AAG K	GAG E	AAG K	ACT T	AAG K	GCT A	GAA E	TTG L	5148 1716
GCC A	TGG W	TTA L	GAG E	CAT H	CAA Q	AAA K	AAA K	CAT H	CTA L	CGA R	GAC D	AAA K	GGA G	GAG E	GAT D	GAT D	AAA K	ATG M	CCC P	CGC R	TCC S	5214 1738
GGA G	AGA R	AAC N	AGC S	GTG V	GTT V	TGC C	TTT F															5238 1746
TAAGGTTGCA GCAAGAAAAG GCAGAAATAA AACGTCTTCA AGAAGCCAAT AAGGCAGCTC GGAAGGAAAAG ACAGCTGATT																						5318
CTTAAACAGC AGGAGGAGAT AGAAAAGATC CGACAGACCA CCATAAAAAC TACAGGAGAA ATTGAAGTCT GCAGGGGAGA																						5398
GTAAATTGGA CTCTCATAGT GATGATGATA CAAAGGATAA TAAGGCAACC AGTCCTGGTC CAACTGACTT GGAGACCCGC																						5478
AGTCCTTCTC CCATTTCAAT CTCCAGCAGT GAAACTAGCA GCATTATGCA GAAACTGAG AAAATGAGAA GCCGCATGGA																						5558
TGAAAAGTTT CTGACAAAGC GGGAGCAAAA ATTAATGCAA CGGCGACAAC ATGCAGAGGA GCTCCTAGAG TGGAAGCGAC																						5638
GTTTAGATGC AGAAGAAGCA GAAATTCGTC AAATGGAAAA ACAAGCTTTG GCTGCCTGGG ACAAAGAATT AATAAAACCC																						5718
AAAACCTCTA AGAAAGAACT GGAGGACCAG AGAACAGAAC AGAAAGAAAT AGCAAGTGAA GAG																						5781

Abb. 1: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von 1142

Die Numerierung der Nukleotidsequenz beginnt mit dem Adenin des Startcodons, der 5'-untranslatierte Bereich wurde darauf bezogen mit negativen Zahlenwerten versehen. Die fünf Kernlokalisierungssignale (NLS) sind grau, die Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle schwarz unterlegt. Eine NR-Box ist umrandet. Das Stopcodon ist fett und kursiv, die Polyadenylierungssignale fett und unterstrichen dargestellt. Die zu KIAA0480 homologe Sequenz im 3'-UTR ist unterstrichen.

Der Vergleich mit einer ständig aktualisierten GenDatenbank (EMBL-Datenbank) zeigte auch mit der vervollständigten Sequenz keine Übereinstimmung zu bereits beschriebenen Proteinen. Gefunden wurden aber Homologien zu EST-Sequenzen aus Mensch, Ratte und Maus (s. Tab. 1). Die humanen EST-Klone entstammten zum überwiegenden Teil Keimbahnzellen, was mit dem in der Northern-Analyse beobachteten Expressionsverhalten korreliert. Gemeinsam ist den meisten der humanen Sequenzen, daß die Homologie zu 114-2 an der internen, Adenin reichen Region beginnt (Position 3513) und sich Richtung 5'-Ende fortsetzt. Es scheint, daß die cDNA-Synthese präferentiell in diesem Bereich gestartet wird. Die hohen Übereinstimmungen auf Nukleotidebene zu den Sequenzen aus Ratte und Maus weisen auf die Existenz homologer Proteine in diesen Organismen hin. Die cDNA von 114-2 zeigt im endständigen Teil der 3'-untranslatierten Region perfekte Homologie zu der codierenden Sequenz des Proteins KIAA0480 (ab Pos. 5565, s. Tab. 1). Jedoch fehlt eine Übereinstimmung zu den ersten 105 Nukleotiden der veröffentlichten Sequenz von KIAA0480. Das Startcodon liegt an Position 5593 der cDNA von 114-2 (s. Abb. 1), entsprechend Position 134 der cDNA von KIAA0480. Die offenen Leserahmen des 114-2 Proteins und des KIAA0480 Proteins werden durch mehrere Stopcodons in allen drei Leserastern getrennt. Daß es sich bei der isolierten Sequenz um eine chimäre cDNA handeln könnte, wird dadurch ausgeschlossen, daß der Übergang der cDNA von 114-2 in die cDNA von KIAA0480 durch einen unabhängigen EST-Klon (DKFZp434I1118, Positionen 2320 bis 5781, s. Tab. 1) bestätigt wird. Das Gen für KIAA0480 liegt auf dem menschlichen Chromosom 1. Und auch 114-2 wird über einen STS-Klon (SHGC-63646) auf Chromosom 1 kartiert. Der 5'-Terminus der 114-2 cDNA zeigt eine starke Übereinstimmung zu einem EST-Klon der Maus (vw97e10). Diese Homologie reicht in 5'-Richtung über das ermittelte Startcodon hinaus. Homologien zwischen unterschiedlichen Spezies in nicht codierenden Sequenzen sind selten, so daß sich möglicherweise der codierende Bereich trotz des einen Stopcodons im Leserahmen - vielleicht durch Verschiebung des Leserasters auf Grund einer fehlerhaften Sequenzierung - weiter in Richtung 5'-Ende fortsetzt, als in Abb. 1 beschrieben.

mRNA	Ursprung	Gewebe	Länge	Identitäten	% Homologie	von Position	bis Position
KIAA0480	Mensch	Gehirn	6111	217/217	100	5565	5781
EST-Sequenz							
DKFZp434I1118_r1_s1	Mensch	Hoden	443 740	438/443 304/307	98 99	2320 5475	2761 5781
os98b03.s1	Mensch	Keimzelltumor	345	328/336	97	3178	3513
qx90b04.x1	Mensch	Keimzelltumor	511	495/503	98	3011	3513
tt50f08.x1	Mensch	Keimzelltumor	510	489/497	98	3017	3513

nz89d06.s1	Mensch	Keimcenter B Zellen	448	439/439	100	4726	5164
ob93a05.s1	Mensch	Keimcenter B Zellen	307	130/130	100	3384	3513
zs94e12.r1 .s1	Mensch	Keimcenter B Zellen	455 339	454/455 317/325	99 97	2519 3189	3139 3513
nc07b10.r1	Mensch	Prostata Epithel	389	378/383	98	1933	2314
nc07b11.s1	Mensch	Prostata Epithel	352	329/338	97	3176	3513
om16f09.s1	Mensch	Hoden, Lunge oder B Zellen	354	341/349	97	3165	3513
HUMHBC4136	Mensch	Pancreas Insel Zellen	169	133/136	97	1321	1456
hbc876	Mensch	Pancreas Insel Zellen	265	62/64	96	1988	2050
UI-R-C1-kf-g-07-0- UL.s1	Ratte	Gehirn	394	325/374	86	795	1168
EST218236	Ratte	Muskel	449	41/44	93	3307	3350
vw97e10.y1 .r1 .x1	Maus	Thymus	376 386 335	171/178 173/181 292/332	96 95 87	-162 -146 829	14 34 1159
uj37d02.x1	Maus	Niere	509	118/141	83	5418	5558
uj30g10.x1	Maus	Niere	338	101/119	84	5440	5558

Tab. 1: Nukleotidsequenzhomologe zu 1142

Angegeben sind die EST-Sequenzen mit signifikanter Homologie, die Länge der sequenzierten Abschnitte, sowie die Übereinstimmungen der überlappenden Bereiche mit dem Grad der Homologie. Die Positionen der Überlappungen beziehen sich auf die in Abb. 1 gezeigte Sequenz von 114-2.

Die translatierte Nukleotidsequenz von 114-2 zeigt, abgesehen von fünf voneinander unabhängigen, potentiellen Kernlokalisierungssignalen (nuclear localization signals, NLS) und einer Tyrosinkinasephosphorylierungsstelle, keine auffälligen Proteinmotive, so daß es daher nicht möglich ist, auf eine Funktion von 114-2 zu schließen. Die Kernlokalisierungssignale, sowie deren Anzahl, deuten jedoch darauf hin, daß es sich um ein Zellkernprotein handelt und kann als Hinweis auf eine mögliche Beteiligung an der Transkription angesehen werden.

2.2 Expression der codierenden 114-2 Sequenz *in vitro*

Um zu untersuchen, ob der ermittelte offene Leserahmen tatsächlich für ein Protein der erwarteten Größe codiert und die Signale für den Translationsstart und -stop funktionell sind, wurde ein Vektor konstruiert, der stromabwärts von einem viralen Promotor die gesamte isolierte Sequenzinformation von 114-2 trägt. Dazu wurden die überlappenden cDNA-Subklone in mehreren Schritten aneinander ligiert. Weder ein Translationsstart noch ein Translationsstop bzw. Polyadenylierungssignal wurden zusätzlich artifiziiert eingebracht.

Im Anschluß an die Klonierung erfolgte die gekoppelte *in vitro* Transkription/Translation im Reticulozytenlysat in Anwesenheit von ^{35}S -Methionin (s. Abb. 2). Als Positivkontrolle diente ein Expressionsvektor für rSRC-1e, der in vorhergehenden Experimenten eine korrekte Expression gezeigt hatte (L. Klein-Hitpaß, unveröffentlicht).

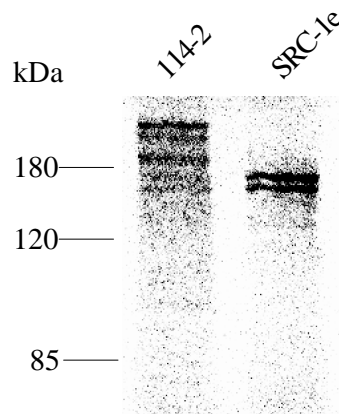


Abb. 2: *in vitro* Transkription/Translation der vollständigen 114-2 cDNA

Für die *in vitro* Transkription/Translation im Reticulozytenlysat wurden die Plasmide pB114-2Voll und pSG6-SRC1e eingesetzt. Die Produkte wurden in einer 8 % SDS-PAGE getrennt und mit Hilfe des BioImagers BAS1500 (Fuji) detektiert.

Die Abb. 2 zeigt, daß von dem konstruierten Vektor mit der vollständigen codierenden cDNA von 114-2 mehrere Peptide exprimiert wurden, deren Größen über 180 kDa liegen. Für die *in vitro* Expression ist demnach ein entsprechend großer, offener Leserahmen vorhanden. Zudem müssen sowohl der Translationsstart als auch der Translationsstop funktionell sein. Die isolierte cDNA-Sequenz codiert also für ein translatierbares Protein.

2.3 Detektion des 114-2 Proteins durch einen spezifischen Antikörper

Die *in vitro* Expression der isolierten cDNA-Sequenz gibt keinen Aufschluß über das natürliche Protein, seine Größe, Verteilung und zelluläre Lokalisation. Zur Detektion des natürlichen 114-2 Proteins wurden daher polyklonale Antikörper gegen ein bakteriell exprimiertes GST-Fusionsprotein (AS 1426 bis 1580, s. Abb. 1) generiert. Dieser Antikörper wurde gegen einen Extrakt aus *E. coli*-Zellen, die GST exprimierten, vorgereinigt und anschließend gegen das GST-Fusionsprotein affinitätsgereinigt.

Western-Analysen sollten zeigen, ob der gereinigte, polyklonale Antikörper in der Lage ist, das in Eukaryonten exprimierte Vollängenprotein zu erkennen. Dazu wurde die vollständige 114-2 Sequenz in einen eukaryontischen Expressionsvektor kloniert. Für eine Western-Analyse wurden in einer SDS-PAGE Ganzzellextrakte von HeLa-Zellen aufgetrennt, die mit diesem

114-2-Vektor transient transfiziert worden waren. Zusätzlich wurde ein *in vitro* Transkriptions/Translationsansatz von 114-2 aufgetragen. Jedoch wurde in keiner Probe von dem affinitätsgereinigten Antikörper spezifisch ein Protein erkannt. Der polyklonale Antikörper ist demnach nicht in der Lage, das 114-2 Vollängen-Protein mit ausreichender Empfindlichkeit zu erkennen. Somit konnten mit diesem Antikörper im Rahmen dieser Arbeit keine Analysen des zellulären Proteins durchgeführt werden.

2.4 Analyse der Interaktion zwischen 114-2 und dem Progesteron-Rezeptor

Mit Hilfe des „two-hybrid“ Systems wurde die hormonabhängige Interaktion zwischen dem Progesteron-Rezeptor und 114-2 gezeigt (Schwerk, 1996). In dieser Arbeit sollten durch Einsatz alternativer Methoden diese Ergebnisse reproduziert werden, um somit den Befund der Interaktion zu bestätigen.

2.4.1 Gelretardationsanalysen

In Gelretardationsanalysen ist der Progesteron-Rezeptor in der Lage, hormonabhängig und spezifisch ein Progesteron-Rezeptor responsables Element zu binden. In dieser *in vitro* Analyse erfolgt diese Bindung sowohl in Anwesenheit des Progesteron-Agonisten R5020, als auch des Antagonisten RU486. Auf Grund der Interaktion von 114-2 mit dem Progesteron-Rezeptor in den „two-hybrid“ Analysen sollte das 1142 Protein an diesen ternären Komplex aus Rezeptor, DNA und Ligand binden können und auf diese Weise die Retardation vergrößern. Diese Bindung sollte aber nur in Anwesenheit des Agonisten, nicht aber des Antagonisten erfolgen.

Es wurde eine Gelretardationsanalyse mit radioaktiv markiertem Oligodesoxyribonukleotid durchgeführt, bei der den Ansätzen zusätzlich *in vitro* exprimiertes 114-2 zugegeben wurde, und zwar derjenige Anteil, der im „two hybrid“ System die Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor zeigte. Jedoch konnte keine zusätzliche Retardation des ternären Komplexes weder mit R5020 noch mit RU486 beobachtet werden (nicht gezeigt).

Um zu untersuchen, ob der Anteil an gebildetem, quarternären Komplex aus DNA, Rezeptor, Ligand und 114-2 für eine Detektion mit dem markierten Oligodesoxyribonukleotid zu gering ist, wurde in gleichen Ansätzen statt der DNA das 114-2 Protein radioaktiv markiert eingesetzt. Jedoch konnten auch in diesem Experiment (nicht gezeigt) keine retardierten, quarternären Komplexe beobachtet werden.

Es war also nicht möglich, in Gelretardationsanalysen eine Interaktion zwischen dem Progesteron-Rezeptor und 114-2 nachzuweisen.

2.4.2 GST-Fusionsprotein Interaktionsanalyse

Eine weitere Möglichkeit, eine physikalische Interaktion *in vitro* zu untersuchen, stellt die GST-Fusionsprotein Interaktionsanalyse dar. Dazu wird ein GST-Fusionsprotein an Glutathion-Sepharose immobilisiert und anschließend mit einem radioaktiv markierten Zielprotein inkubiert.

Bindet das Zielprotein an das GST-Fusionsprotein, kann dies an Hand der radioaktiven Markierung nachgewiesen werden. Als Zielprotein für diese Analyse wurde der im „two-hybrid“ System festgelegte, interagierende Teil des 114-2 Proteins *in vitro* exprimiert. Als immobilisiertes GST-Fusionsprotein wurde der carboxyterminale Teil des Progesteron-Rezeptors gewählt, der schon beim Durchsuchen der cDNA-Bank mit dem „two-hybrid“ System eingesetzt worden war (Schwerk, 1996). Die Analyse zeigte jedoch auch in Anwesenheit von 10^{-6} M R5020 keine spezifische Interaktion des Progesteron-Rezeptors mit dem *in vitro* exprimierten 1142 Protein (nicht gezeigt). Das Ergebnis des „two-hybrid“ Systems konnte mit den eingesetzten *in vitro* Interaktionsanalysen nicht bestätigt werden.

2.5 Einfluß von 114-2 auf die Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor

Obwohl in den *in vitro* Interaktionsanalysen die physikalische Interaktion zwischen dem Progesteron-Rezeptor und 114-2 nicht bestätigt werden konnte, bestand dennoch die Möglichkeit, daß 114-2 funktionellen Einfluß auf den Progesteron-Rezeptor ausübt. Um dies zu untersuchen, wurden Reporteranalysen durchgeführt. Dazu wurde eine Zelllinie, die den Progesteron-Rezeptor stabil exprimiert (HeLa3B2) mit einem Progesteron-Rezeptor verantwortlichen Luciferase-Reportergenkonstrukt und einem Expressionsvektor für 114-2 transient cotransfiziert. Zum Vergleich wurden Zellen mit dem leeren Expressionsvektor transfiziert. Nach Hormonstimulus wurde die Aktivität des exprimierten Reportergens in Extrakten dieser Zellen gemessen und miteinander verglichen. Ein Einfluß des transient exprimierten 114-2 Proteins auf die Fähigkeit des Progesteron-Rezeptors zur Transaktivierung sollte sich in unterschiedlichen Aktivitäten äußern. Um mögliche zusätzliche funktionelle Domänen von 114-2 mit einzubeziehen, wurde die Analyse mit einem Expressionsvektor durchgeführt, in den die codierende Region vollständig integriert war.

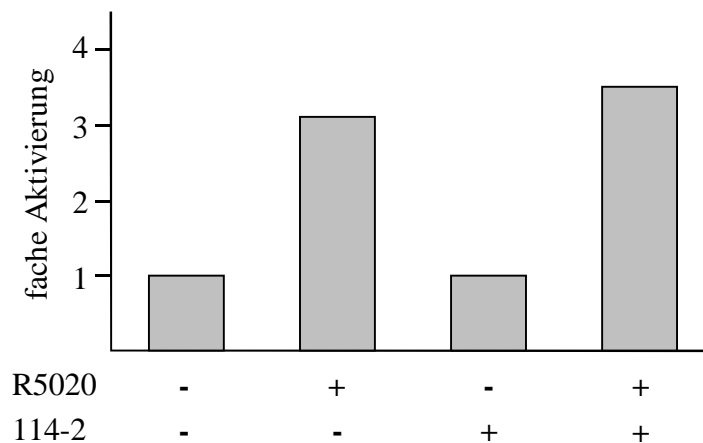


Abb. 3: Reporteranalyse: Einfluß von 114-2 auf die PR-Transaktivierung

HeLa3B2-Zellen wurden mit 1 µg PRE₂-tk-luc und mit 1 µg pSG6-114-2 bzw. 1 µg pSG6 durch Lipofektin transient cotransfiziert. Die Hormonstimulierung mit 10⁻⁸ M R5020 bzw. dem gleichen Volumen an 10 % EtOH erfolgte 20 Stunden nach Transfektion für nochmals 6 Stunden. Die Mittelwerte der Reporteraktivitäten aus Doppelbestimmungen wurden jeweils auf die nicht stimulierte Reporteraktivität der entsprechenden Cotransfektion normiert.

Wie Abb. 3 darstellt, ist eine hormonabhängige Aktivierung des Reportergens durch den Progesteron-Rezeptor um das Dreifache der nicht stimulierten Transkription festzustellen. In Anwesenheit von 114-2 ist keine signifikante Veränderung in der Aktivierung des Reportergens zu beobachten. Innerhalb dieser Versuchsanordnung ist 114-2 also nicht in der Lage, einen Einfluß auf die Progesteron-Rezeptor vermittelte Transaktivierung auszuüben. Abgesehen von den Ergebnissen der Hefe-„two-hybrid“-Experimente konnten im Rahmen dieser Arbeit somit keine weiteren Hinweise für eine Beteiligung des 114-2 Proteins als Cofaktor der Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung gefunden werden.

3 Charakterisierung von 116

3.1 Analyse der Expression von 116 mit Hilfe von Northern-Hybridisierungen

Das Expressionsverhalten von 116 wurde mittels Northern-Analyse von RNAs multipler humaner Gewebe untersucht. Die geringe Signalstärke wies darauf hin, daß es sich in Bezug auf die Expression von 116 um ein seltenes Transkript handeln müßte (Schwerk, 1996).

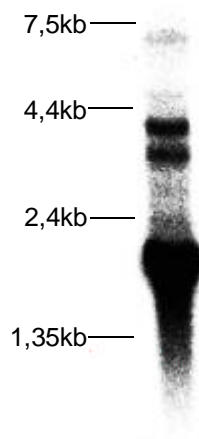


Abb. 4: Northern-Analyse von 116 Transkripten

10 µg polyA⁺-RNA aus HeLa-Zellen wurden mit einer 116 spezifischen Sonde (Pos. 541 bis 1426, s. Abb. 7) hybridisiert. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem BioImager BAS1500 (Fuji).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurde im Rahmen dieser Arbeit erneut eine Northern-Analyse, diesmal mit poly A⁺-RNA aus HeLa-Zellen, durchgeführt. Wie Abb. 5 zeigt, sind insgesamt vier Signale einer Größe von etwa 1,5 bis 7 kb zu beobachten, wobei das kleinste das mit Abstand häufigste Transkript ist. Die Signale der größeren Transkripte sind möglicherweise auf nahe verwandte Genen, ungespleißte RNA oder Spleißvarianten zurückzuführen. Auch eine differentielle Terminierung der mRNA könnte für zusätzliche Signale in der Northern Analyse verantwortlich sein. So konnten später insgesamt fünf cDNA-Sequenzen isoliert werden, die einen längeren 3'-untranslatierten Bereich besitzen. Möglicherweise ist der unterschiedliche Gebrauch von Polyadenylierungssignalen bei der Modifikation des Primärtranskriptes für diese Varianten verantwortlich. Daß es sich um cDNA-Sequenzen handelt, wurde aus dem Vergleich mit der genomischen Sequenz ermittelt (s. Abb. 9), wobei jedoch nicht auszuschließen ist, daß es sich um unvollständig prozessierte Varianten handelt. Die Population der längeren Transkripte ist jedoch im Vergleich zum Hauptprodukt nur sehr klein.

3.2 Isolierung der vollständigen codierenden cDNA-Sequenz von 116

Die Länge der beschriebenen cDNA-Sequenz von 116 beträgt 1554 bp (Schwerk, 1996). Der 3'-Terminus enthält ein Stop-Codon und eine Adenin reiche Sequenz, die dem polyA-Schwanz der mRNA entsprechen könnte. Somit ist es wahrscheinlich, daß es sich hierbei um das 3-Ende des natürlichen Transkripts handelt, obwohl ein vorhandenes Polyadenylierungssignal (*consensus*: AATAAA; Proudfoot, 1991) statt der üblichen 30 bp etwa 150 bp vom poly-A-Schwanz entfernt liegt. Das 5'-Ende der cDNA war in einem offenen Leserahmen an die Gal4 Aktivierungsdomäne fusioniert. Verlängerungen in Richtung 5'Ende waren daher noch zu erwarten.

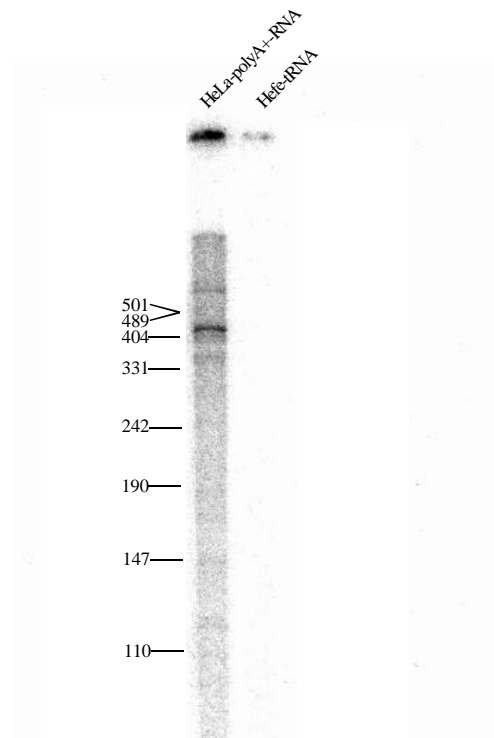


Abb. 5: Primer Extensionsanalyse: Untersuchung des 5'-Terminus von 116

Eingesetzt wurden 10 µg HeLa-polyA⁺-RNA bzw. Hefe-tRNA und je 2 pmol 5'-endmarkiertes Oligodesoxyribonukleotid. Die Trennung der Produkte erfolgte in einem 6 % Polyacrylamid- / 8 M Harnstoffgel. Die Signale wurden mit Hilfe des BioImagers BAS1500 (Fuji) detektiert.

Um die Länge der Sequenz bis zum 5'-Ende des Transkriptes zu bestimmen, wurde eine Primer Extensionsanalyse durchgeführt. Ein zur 116 mRNA komplementäres Oligodesoxyribonukleotid (s. Abb. 6) wurde an HeLa polyA⁺-RNA hybridisiert und mit Hilfe von Reverser Transkriptase verlängert. Die Länge des entstehenden Produktes ist dabei von der Länge der zur Verfügung stehenden Matrize abhängig. Wie Abb. 5 zeigt, beträgt die Größe der synthetisierten cDNA etwa 420 bis 450 Nukleotide. Da der Primer etwa 120 Nukleotide von dem bis dahin ermittelten Ende der Sequenz entfernt liegt, weist diese Analyse darauf hin, daß bis zum 5'-Ende der mRNA noch etwa 300 bis 330 Nukleotide fehlen.

Um die codierende Nukleotidsequenz von 116 weiter zu vervollständigen, wurde zunächst eine HeLa cDNA-Bank mittels PCR durchsucht. Dabei ist es gelungen, eine Sequenz zu amplifizieren, die sowohl an ihrem 5'-Ende als auch an ihrem 3'-Ende mit der bekannten 116-Sequenz überlappt, intern jedoch eine zusätzliche Sequenz von 129 bp trägt. Diese 129 bp codieren innerhalb des bekannten Leserahmens für 43 zusätzliche Aminosäuren. Möglicherweise handelt es sich hierbei um ein alternatives Exon.

Ein weiteres Durchsuchen dieser cDNA-Bank wie auch einer Bibliothek von cDNA-Bänken verschiedener humaner Gewebe (Clontech quick screen cDNA library panel) mittels PCR führten zu keiner weiteren Verlängerung der bereits bekannten Sequenz.

In einem alternativen Ansatz, in dem eine humane, fötale Hirn cDNA-Bank (Clontech HL3003a) mittels Filterhybridisierung von PhagenPlaques durchmustert wurde, konnten vier cDNA-Klone gefunden werden, die in Richtung 5'-Ende Verlängerungen der bekannten Sequenz darstellen. Vergleiche mit einer Nukleotid-Datenbank (EMBL) zeigten jedoch, daß diese Sequenzen durch Fusionen an fremde, Protein codierende Sequenzen oder an genomische bzw. mitochondriale DNA erzeugt worden sind. Drei dieser vier Klone besitzen einen kurzen, gemeinsamen Sequenzabschnitt, der über das bisher bekannte Ende der cDNA hinausgeht. Innerhalb dieser kurzen Sequenz wird in dem ermittelten, offenen Leserahmen ein Methionin codiert, das als Startcodon des natürlichen Transkripts dienen könnte. Die cDNA-Sequenz von 116 ist damit auf 1693 bp angewachsen, die für 450 AS mit einem Molekulargewicht von 52,8 kDa codieren (s. Abb. 6). Die Größe der isolierten cDNA-Sequenz korreliert mit der Größe des Haupttranskripts von etwa 1,7 kb der Northern-Analyse (s. Abb. 4). Dies wird als Hinweis gewertet, daß die cDNA-Sequenz des Haupttranskripts vollständig isoliert worden ist.


Parallel zu den Bemühungen, die humane cDNA-Sequenz von 116 aufzuklären, ist die homologe Sequenz der Ratte isoliert worden (L. Klein-Hitpaß, unveröffentlicht). Die Homologie auf Nukleotidebene ist sehr hoch (79 %) und steigt noch beim Vergleich auf Aminosäureebene

(86 %). Erstaunlicherweise beginnt der N-Terminus des Ratten-Homologen mit dem für die humane Sequenz

ermittelten Start-Codon. Zudem enthält die cDNA der Ratte eine Sequenz, die den zusätzlichen 129 bp der menschlichen Sequenz entsprechen.

																									TTTCTTTT CTGCCGGGTA -1
ATG	GCT	GCT	TCC	AAG	ACC	CAG	GGG	GCT	GTC	GCC	CGA	ATG	CAG	GAA	GAC	CGT	GAT	GGG	AGC	TGC	AGC				66
M	A	A	S	K	T	Q	G	A	V	A	R	M	Q	E	D	R	D	G	S	C	S				22
ACA	GTC	GGG	GGT	GTA	GGT	TAT	GGG	GAC	AGT	AAG	GAT	TGT	ATC	CTG	GAG	CCG	CTT	TCC	CTG	CCA	GAA				132
T	V	G	G	V	G	Y	G	D	S	K	D	C	I	L	E	P	L	S	L	P	E				44
AGT	CCA	GGT	GGC	ACC	ACC	ACT	TTA	GAA	GGT	TCT	CCA	TCT	GTG	CCT	TGT	ATT	TTC	TGT	GAA	GAA	CAT				198
S	P	G	G	T	T	L	E	G	S	P	S	S	V	P	C	I	F	C	E	E	H				66
TTT	CCT	GTG	GCT	GAA	CAA	GAC	AAA	CTT	CTG	AAG	CAC	ATG	ATT	ATT	GAG	CAT	AAG	ATT	GTC	ATA	GCT				264
F	P	V	A	E	Q	D	K	L	L	K	H	M	I	I	E	H	K	I	V	I	A				88
GAT	GTC	AAG	TTG	GTT	GCT	GAT	TTC	CAA	AGT	TAC	ATT	TTA	TAT	TGG	AGG	AAA	AGG	TTC	ACT	GAA	CAG				330
D	V	K	L	V	A	D	F	Q	R	Y	I	L	Y	W	R	K	R	T	T	E	Q				110
CCC	ATC	ACA	GAT	TTT	TGT	AGT	GTA	ATA	AGA	ATT	AAT	TCC	ACT	GCT	CCA	TTT	GAA	GAA	CAA	GAG	AAT				396
P	I	T	D	F	C	S	V	I	R	I	N	S	T	A	P	F	E	E	Q	E	N				132
TAT	TTT	TTG	TTA	TGT	GAC	GTT	TTA	CCA	GAA	GAT	AGA	ATT	CTT	AGA	GAA	GAG	CTT	CAG	AAA	CAG	AGA				462
Y	F	L	L	C	D	V	L	P	A	D	R	I	L	R	E	E	L	Q	K	Q	R				154
CTG	TGA	GAA	ATT	CTG	GAA	CAA	CAG	CAG	CAA	GAA	CGA	AAT	GAT	ACC	AAT	TTT	CAT	GGC	GTT	TGT	ATG				528
L	R	E	I	L	E	O	O	O	E	R	N	D	T	N	F	H	G	V	C	M					176
TTT	TGC	AAT	GAA	GAA	TTC	CTT	GGA	AAC	AGA	TCT	GTT	ATT	TTG	AAC	CAC	ATG	GCC	AGA	GAA	CAT	GCT				594
F	C	N	E	F	L	G	N	R	S	V	I	L	L	N	H	M	A	R	E	H	A				198
TTC	AAC	ATT	GGA	TTG	CCA	GAC	AAC	ATT	GTA	AAC	TGC	AAT	GAA	TTT	TTG	TGT	ACA	TTA	CAG	AAA	AAG				660
F	N	I	G	L	P	D	N	J	V	N	C	E	F	L	C	T	L	O	K	K					220
CTT	GAC	AAT	TTG	CAG	TGC	TTG	TAC	TGT	GAG	AAG	ACC	TTC	AGG	GAC	AAA	AAT	ACA	CTT	AAA	GAT	CAC				726
L	D	N	L	Q	C	L	Y	C	E	K	T	F	R	D	K	N	T	L	T	D	H				242
ATG	AGG	AAA	AAA	CAG	CAT	CGT	AAG	ATT	AAT	CCT	AAG	AAC	AGA	GAA	TAT	GAC	AGA	TTT	TAT	GTC	ATC				792
M	R	K	K	Q	H	R	K	I	N	P	K	N	R	E	Y	D	R	F	Y	V	I				264
AAT	TAT	TTG	GAA	CTT	GGA	AAA	TCG	TGG	GAA	GAA	GTT	CAG	TTG	GAA	GAT	GAT	CGG	GAG	TTG	CTG	GAC				858
N	Y	L	E	L	G	K	S	W	E	E	V	Q	L	E	D	D	R	E	L	L	D				286
CAT	CAG	GAA	GAT	GAC	TGG	TCT	GAT	TGG	GAA	GAA	CAC	CCT	GCC	TCT	GCA	GTC	TGC	TTA	TTT	TGT	GAA				924
H	O	E	D	D	W	S	E	E	E	H	P	A	S	A	V		C	L	F	C	E				308
AAG	CAA	GCA	GAA	ACA	ATT	GAG	AAG	TTG	TAT	GTC	CAC	ATG	GAG	GAT	GCA	CAC	GAA	TTT	GAT	CTT	CTC				990
K	Q	A	E	T	I	E	K	L	Y	V	H	M	E	D	A	H	E	F	D	L	L				330
AAA	ATA	AAG	TCA	GAA	CTT	GGA	TTA	AAT	TTC	TAT	CAG	CAA	GTG	AAA	CTG	GTC	AAT	TTT	ATT	CGG	AGG				1056
K	I	K	S	E	L	G	L	N	Y	Q	O	V	K	L	V	N	F	I	R	G	R				352
CAA	GTT	CAC	CAA	TGC	AGA	TGT	TAT	GGC	TGC	CAT	GTG	AAG	TTC	AAA	TCC	AAA	GCA	GAC	TTA	AGA	ACT				1122
Q	V	H	Q	C	R	C	Y	G	C	H	V	K	F	K	S	K	A	D	L	R	T				374
CAC	ATG	GAA	GAA	ACT	AAA	CAC	ACT	TCG	CTG	CTC	CCC	GAT	AGA	AAG	ACG	TGG	GAT	CAA	CTG	GAT	TAT				1188
H	M	E	E	I	K	H	T	S	L	L	P	D	R	K	T	W	D	Q	L	E	Y				396
TAT	TTT	CCA	ACC	TAT	GAA	AAT	GAC	ACT	CTC	CTG	TGT	ACA	CTA	TCT	GAC	AGT	GAA	AGT	GAC	CTG	ACA				1254
Y	F	P	T	Y	A	N	D	T	L	L	C	T	L	S	D	S	E	S	D	L	T				418
GCT	CAG	GAA	CAA	AAT	GAA	AAT	GTT	CCC	ATC	ATC	AGT	GAA	GAT	ACA	TCT	AAA	CTG	TAT	GCT	TTG	AAA				1320
A	Q	E	Q	N	E	N	V	P	I	I	S	E	D	T	S	K	L	Y	A	L	K				440
CAA	AGC	AGT	ATT	TTG	AAC	CAG	TTG	CTA	CTA																1350
Q	S	S	I	L	N	Q	L	L	L																450
TAAGAGTACT	TGAAAACCTA	GAAGAACTA	CCACGAAGC	AATTTTTCAT	GTTTTCTCCT	AGAGACAGA	TATGAAAGAA																		1430
CAATTTAAAT	TTGAACATCA	ACAAAAGATT	GGTCCTTGGT	GAAATAAACT	TTTCAAAAAT	GAATGTTCTT	TTCAAAAAT																		1510
AAAGTAGAAA	AATGCACTTA	CTAAGAACAT	GAAAAAAAT	GAAGTAGGAA	AATAAGATGA	AGACTTTGTA	TTTTGGCTGT																		1590
AAAGTTTTAT	TGTGTGATCA	TCTTAAATTA	TCTCACTTCA	TTAACTCGT	AATTATATAT	AGAAGTATAT	GTCCAATTAA																		1670
AAAAAAAAAA	AAAAAAAAAA	AAA																							1693

Abb. 6: Nukleotid- und Aminosäuresequenz von 116

Die Numerierung der Nukleotidsequenz beginnt mit dem Adenin des Startcodons, der 5'-untranslatierte Bereich wurde darauf bezogen mit negativen Zahlenwerten versehen. Das Stopcodon ist kursiv und fett gedruckt, das Polyadenylierungssignal fett und unterstrichen. Die fünf C₂-H₂-Zinkfinger motive (ZF1 bis ZF5) sind unterlegt (■ : *consensus* Zinkfinger motif, ■ : dem *consensus* Motiv nicht vollständig entsprechend, jedoch mit Übereinstimmungen zu Zinkfinger motiven in Datenbanken, ■ : Motiv ohne Übereinstimmung zu bekannten Zinkfingerproteinen. Das NRBox-Motiv ist umrandet. Die 129 bp zusätzlicher Sequenzinformation und die entsprechenden Aminosäuren sind kursiv dargestellt. Alle Spleißstellen sind durch  markiert. Das komplementäre Oligonukleotid, das für die Primer Extensionsanalyse eingesetzt worden ist, ist durch einen Pfeil über der entsprechenden Nukleotidsequenz gekennzeichnet.

3.3 Analyse auf alternatives Spleißen von 116

Um zu untersuchen, ob es sich bei der internen Erweiterung von 129 bp, die sowohl in der humanen cDNA als auch in der homologen Sequenz der Ratte gefunden worden ist, um eine alternative Spleißvariante des 116 Gens handeln könnte, wurde RNA aus unterschiedlichen Rattengeweben in RNase Protektionsanalysen eingesetzt (Abb. 7). Als Sonde diente eine *in vitro* radioaktiv markierte RNA, die komplementär zu den 129 bp und den flankierenden

Sequenzen war. Zusätzlich besaß diese RNA an beiden Enden kurze Bereiche unspezifischer Sequenzen, die dem Vektor entstammten. Nach Hybridisierung sollte diese RNA durch Verdau der einzelsträngigen Bereiche eine Länge von 456 Nukleotiden für die längere Variante aufweisen. Bei Expression der kürzeren Form sollten zwei Fragmente mit Längen von 175 und 152 Nukleotiden entstehen.

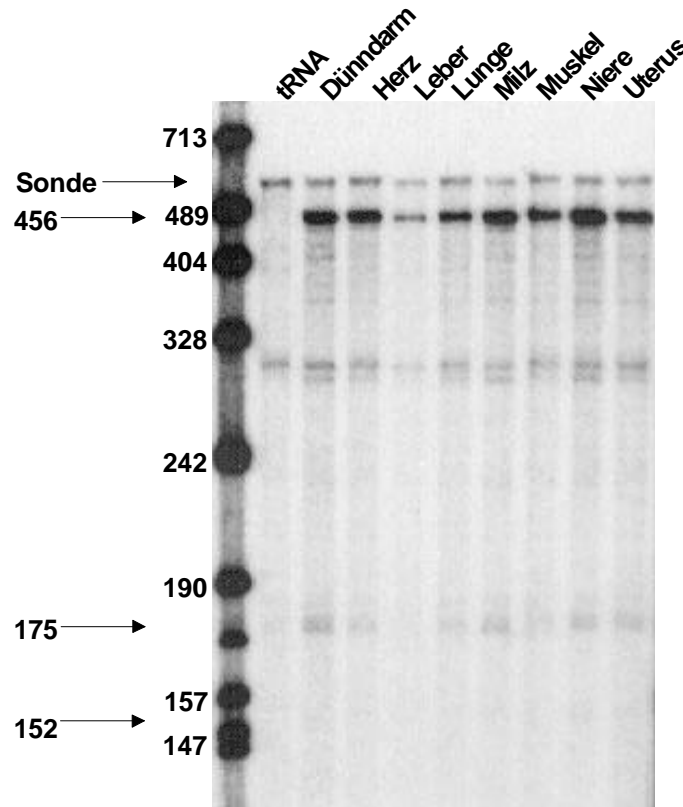


Abb. 7: RNase Protektionsanalyse zum Nachweis von Spleißvarianten des 116 Gens

Eingesetzt wurden nach photometrischer Bestimmung je 20 µg Gesamt-RNA aus den angegebenen Rattengeweben. Die Trennung der Produkte erfolgte in einem 6 % Polyacrylamid-8 M Harnstoffgel. Die Signale wurden mit Hilfe des BioImagers BAS1500 (Fuji) detektiert.

Die in Abb. 7 gezeigte RNase-Protektionsanalyse zeigt deutlich, daß die Sonde in allen Fällen auf eine Größe von 456 Nukleotiden verkürzt wurde. In allen untersuchten Rattengeweben wird demnach die längere Variante von 116 exprimiert. In keiner der Spuren zeigt sich ein Signal in Höhe von 152 Nukleotiden. Das Signal in der Höhe von 175 Nukleotiden ist unspezifisch, da es auch in der Kontrollspur mit Hefe-RNA auftritt. Die kürzere Form von 116 konnte in den hier untersuchten Rattengeweben nicht nachgewiesen werden. Somit gibt die Analyse keinen Hinweis auf ein alternatives Spleißen des 116 Primärtranskripts.

Die Analyse zeigt jedoch, daß die 116 RNA ubiquitär und mit gleicher Intensität exprimiert wird, da in allen Proben an Hand der photometrischen Bestimmung die gleiche Menge an Gesamt-RNA eingesetzt wurde. Reproduktionen dieses Experiments relativierten die vermeintlichen Schwankungen in der Signalstärke, wie sie in dieser Abb. etwa für Leber auszumachen ist. Die ubiquitäre Expression des 116 Gens erfolgt in den unterschiedlichen Geweben somit erstaunlich konstant.

3.4 Analyse der Nukleotidsequenz von 116

Der Vergleich der isolierten cDNA-Sequenz mit einer Nukleotid-Sequenz Datenbank erbrachte keine Übereinstimmung zu neuerlich charakterisierten Proteinen. Jedoch nahm die Zahl an EST-Sequenzen, die Homologien zu der ermittelten Sequenz besitzen, deutlich zu. Mit Ausnahme des extremen 5Endes der cDNA (bis Pos. 23, s. Abb. 6) ist die komplette Sequenz durch EST-Sequenzhomologe aus den unterschiedlichsten Geweben

überspannt. Zur Zeit finden sich Übereinstimmungen zu dreißig menschlichen EST-Sequenzen, zu vierzehn EST-Sequenzen der Maus und zu jeweils einem Homologen aus Ratte, Rind und Schwein. Der Grad der Homologie auf Nukleotidebene ist dabei sehr hoch (Mensch: 93- 100 %, Maus: 82 - 89 %, Ratte: 86 %, Rind: 89 %, Schwein: 91 %).

Neben diesen Homologien auf Nukleotidebene findet sich eine ausgesprochen hohe Übereinstimmung der translatierten Nukleotidsequenz zu translatierten EST-Sequenzen des Nematoden *C. elegans*, die zu einem putativen Protein (F46B6) zusammengefaßt worden sind.

Durch Translation der Nukleotidsequenz in die Aminosäuresequenz sollten über bekannte Proteinmotive Hinweise auf eine mögliche Funktion des Proteins gewonnen werden. So konnten insgesamt fünf Motive für Zinkfinger des C₂-H₂-Typs festgestellt werden. Zwei der fünf Motive entsprechen der *consensus*-Sequenz, während zwei weitere Homologie zu Motiven bekannter Zinkfinger-Proteine besitzen. Die zusätzlichen 43 Aminosäuren enthalten dabei einen der beiden *consensus* Zinkfinger. Das fünfte, N-terminal gelegene Motiv weist Ähnlichkeit zu dem *consensus*-Sequenz auf, ohne daß eine Homologie zu einem bekannten Zinkfinger-Motiv gefunden werden konnte (s. Abb. 6). Als weiteres Proteinmotiv konnte direkt am Carboxyterminus ein kurzes Sequenzelement ausgemacht werden, das als NR-Box bezeichnet wird (*AS-consensus*: LXXLL). Diese NR-Box ist bei bekannten Coaktivatoren für eine Interaktion mit Kernrezeptoren ausreichend (s. Einleitung). Daher wurde vermutet, daß die NR-Box auch in diesem Fall die Interaktion zwischen 116 und dem Progesteron-Rezeptor vermitteln könnte.

3.5 Bestimmung der genomischen Struktur des 116 Gens

Im Zuge der Sequenzierung des humanen Genoms im Rahmen des „human genome projects“ wurden die vollständig sequenzierten genomischen Insertionen zweier bacterial artificial chromosome“-Klone (BAC, RG313E03 und RG103H13) veröffentlicht, die die gesamte cDNA von 116 beinhalten. Auf Grund der chromosomalen Lokalisation der BAC-Klone kartiert das 116 Gen auf das menschliche Chromosom 7q31.

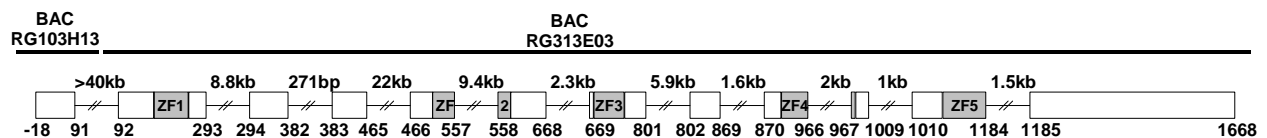


Abb. 8: Genomische Struktur des 116 Gens auf dem humanen Chromosom 7q31

Gezeigt ist die Lage der 116 cDNA bezüglich der genomischen BAC-Sequenzen. Die zwölf Exons sind als Kästen dargestellt, in denen die Zinkfinger-motive markiert sind. Darüber ist die Größe der Introns angegeben. Die Exon/Intron-Übergänge sind an Hand der Positionen in der cDNA-Sequenz gekennzeichnet.

Der Vergleich von genomischer Sequenz und cDNA läßt auf die Exon/Intron-Struktur des Gens schließen (s. Abb. 8). Danach wird 116 in zwölf Exons codiert, deren Größe zwischen 43 bp und etwa 500 bp liegt. Die Größe der sie trennenden Introns beträgt zwischen 271 bp und mehr als 36 kb. Bei allen Exon/Intron-Übergängen handelt es sich um *consensus*-Sequenzen.

Die Veröffentlichung der genomischen Sequenz zeigt die Exon/Intron-Übergänge eines einzelnen 116-Gens, gibt aber keine Auskunft darüber, ob es sich um die einzige Kopie der codierenden Sequenz im humanen Genom handelt. Aufschluß darüber gibt eine Southern-Analyse von restringierter, genomischer DNA (s. Abb. 9). Als Sonde wurde eine cDNA-Sequenz gewählt, die die ersten vier Exons von 116 überspannt (Pos. 60 bis 431) und über ihre ganze Länge radioaktiv markiert worden ist. Keines der eingesetzten Restriktionsenzyme schneidet innerhalb der Sondensequenz. Ohne eine direkte Zuordnung der Signale vorzunehmen, ist eine qualitative Bewertung des Ergebnisses möglich. In jedem Restriktionsansatz ist eine maximale Anzahl von acht Signalen zu erwarten und zwar ein Signal für jedes überspannte Exon innerhalb eines Chromosoms des diploiden Satzes. Dies gilt jedoch nur unter der Voraussetzung, daß es sich um eine einzelne Genkopie handelt. Sollten zwei oder mehr Kopien vorhanden sein, sollte sich auch die Zahl der Signale vervielfachen. Die Zahl der überspannten Exons und die Vielfalt unterschiedlicher Restriktionen sollte die Wahrscheinlichkeit minimieren, zusätzliche Signale zu übersehen. Wie die Analyse zeigt, ist eine maximale Zahl von vier Signalen zu beobachten, mit Ausnahme der AccI-Restriktion, bei der fünf Signale erscheinen. Die Halbierung der erwarteten Zahl ist wahrscheinlich auf eine Konservierung zwischen den Autosomen auch der nicht codierenden Sequenzabschnitte in diesem Bereich zurückzuführen. Die geringere Spezifität der AccI-Schnittstelle führt zu einem zusätzlichen Signal.

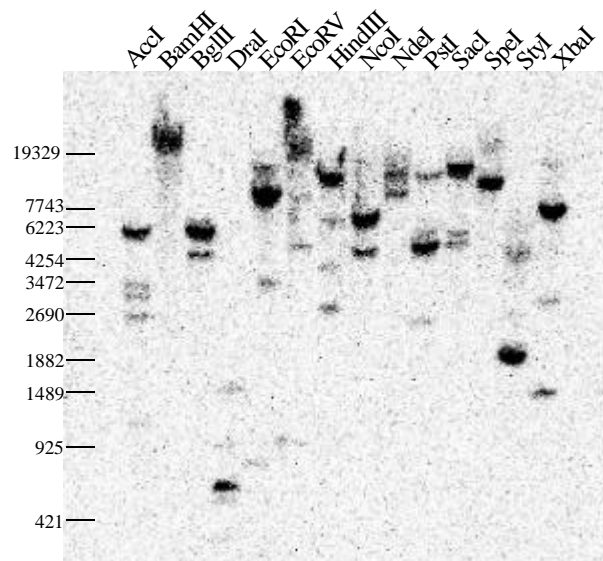


Abb. 9: Southern-Analyse humaner genomischer DNA

Je 10 µg humaner aus Blut gewonnener genomischer DNA wurden mit 20 units der angegebenen Restriktionsenzyme über Nacht inkubiert. Anschließend wurden die Fragmente in einem 0,8 % Agarosegel getrennt und mit einer Kapillarblotvorrichtung auf eine Nylon Membran übertragen. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C. Die Signale wurden mit dem BioImager BAS1500 (Fuji) detektiert.

Aus der Analyse kann man somit schließen, daß im menschlichen Chromosomensatz lediglich eine Kopie des 116 Gens vorhanden ist.

3.6 Untersuchung auf ein unbekanntes Exon von 116

Innerhalb der Sequenz des fünften Introns der 116 Sequenz findet sich ein Abschnitt, der bei Vergleich mit einer Nukleotid Datenbank Homologie zu einem EST-Klon (zr72a07) zeigt. Um zu untersuchen, ob es sich bei dieser Sequenz möglicherweise um ein zusätzliches, nicht erkanntes Exon handelt, wurden R-PCR Analysen auf polyA⁺-RNA aus HeLa-Zellen durchgeführt. Eingesetzt wurden jeweils ein Primer aus den flankierenden 116 Exons und ein Primer aus dem gegenüberliegenden Ende der ESTSequenz. Zur Kontrolle wurde ein Ansatz mit den Primern aus der EST-Sequenz durchgeführt. Während sich die ESTSequenz auf diese Weise amplifizieren ließ, war eine Überbrückung von dem EST zu beiden Seiten der 116-Sequenz nicht möglich. Daraus wurde geschlossen, daß es sich bei dem EST nicht um ein zusätzliches 116 Exon handelt.

3.7 Bestimmung des Transkriptionsstarts

Auf Grund der Veröffentlichung der genomischen DNA war es möglich, das 5-Ende der cDNA genauer zu charakterisieren. Um zu untersuchen, an welcher Stelle der genomischen Sequenz die Transkription initiiert wird, wurden RNase Protektionsanalysen durchgeführt. Zunächst wurde dazu mittels PCR ein genomisches Fragment amplifiziert, das die bekannte cDNA Sequenz in 5'-Richtung verlängert und mit der cDNA bis Position 88 überlappte. Dieses Fragment wurde dann als Matrize zur Synthese einer radioaktiv markierten, komplementären RNA eingesetzt. Durch Hybridisierung an polyA⁺-RNA und Verdau der einzelsträngigen Bereiche sollte es möglich sein den Transkriptionsstart hinsichtlich der genomischen Sequenz zu erkennen.

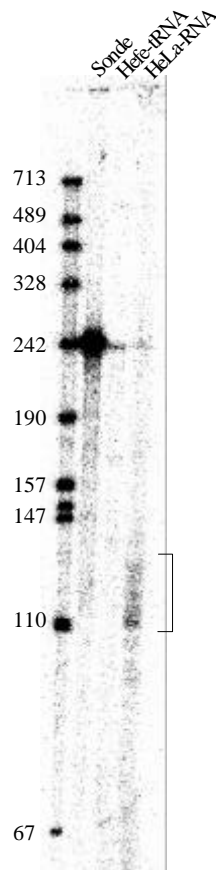


Abb. 10: RNase Protektionsanalyse zur Bestimmung des Transkriptionsstarts von 116

Eingesetzt wurden 10 µg Hefe-tRNA bzw. Gesamt-RNA aus HeLa-Zellen. Die Detektion der Signale erfolgte mit dem BioImager BAS1500 (Fuji).

Wie Abb. 10 zeigt, sind mehrere Signale mit Größen zwischen 110 und 130 Nukleotiden auszumachen. Innerhalb dieses Bereichs wird vermutlich die Transkription initiiert. Damit ist die vollständige cDNA von 116 isoliert worden.

3.8 Detektion des 116 Proteins

3.8.1 Reinigung eines polyklonalen Antikörpers gegen GST-r116

Zur Untersuchung der Eigenschaften des natürlichen 116 Proteins wurden durch Immunisierung von Kaninchen polyklonale Antikörper gegen ein Fusionsprotein aus GST und einer N-terminal gelegenen Domäne des homologen 116-Proteins der Ratte generiert (L. Klein-Hitpaß, unveröffentlicht). Um eindeutige Ergebnisse erzielen zu können, die weitestgehend unbeeinflusst von Kreuzreaktivitäten sein sollten, wurde das erhaltene Rohserum der finalen Blutung zunächst zweifach gegen einen Extrakt GST exprimierender Bakterien adsorbiert. Im Anschluß daran wurden die spezifischen Antikörper auf Grund ihrer Affinität zum Antigen selektioniert. Abb. 11 zeigt den Vergleich zwischen dem zur Reinigung eingesetzten Rohserum und der gereinigten Antikörperlösung in einer Western-Analyse. Deutlich ist die fast vollständige Abnahme der Signale unspezifisch erkannter Proteine aus den Bakterienextrakten wie des Signals für das GST-Protein zu erkennen. Das Epitop hingegen wird von dem Rohserum und dem gereinigten Antikörper mit fast gleicher Intensität erkannt.

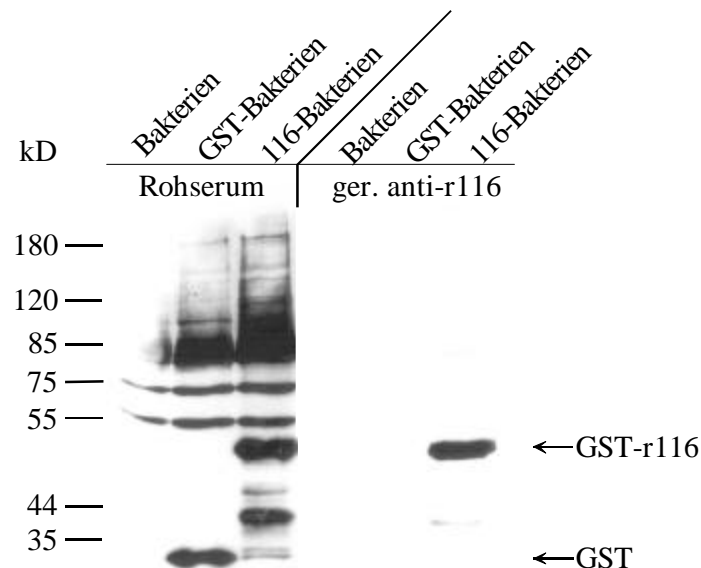


Abb. 11: Affinitätsreinigung des polyklonalen anti-r116-Antikörpers

Nachweis von GST-r116 mit dem polyklonalen Rohserum (Rohserum) oder mit dem affinitätsgereinigten anti-r116-Antikörpers (ger. anti-r116) in Extrakten von *E. coli* RRI (Bakterien), von *E. coli* RRI, die GST exprimierten (GST-Bakterien) und von *E. coli* RRI, die GST-r116 exprimierten.

3.8.2 Verteilung von 116 in säulenchromatographischen Trennungen

Mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gelang es, das natürliche 116 Protein in Rattenleber Kernextrakten durch Western-Analysen nachzuweisen (s. Abb. 12). Es besitzt auf Grund dieser Analysen eine Größe von etwa 55 kD, was der vorhergesagten Aminosäuresequenz entspricht. Auch dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß die vollständige, Protein codierende cDNA isoliert worden ist.

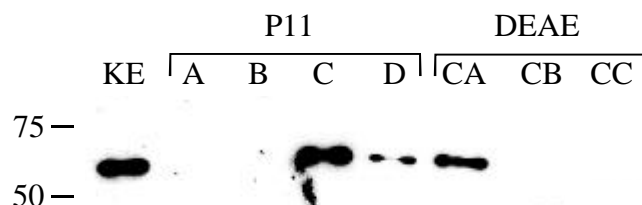


Abb. 12: Western-Analyse: Nachweis von 116 in fraktioniertem Rattenleber Kernextrakt

Eingesetzt wurden 5 µg Rattenleber Kern-Extrakt (KE), je 5 µg der Phosphocellulose P11-Fraktionen A bis D (P11, A-D) und je 1 µg der DEAE-Sepharose-Fraktionen CA bis CC (DEAE). Der Nachweis von 116 erfolgte mit dem affinitätsgereinigten anti-r116-Antikörper.

Um das biochemische Verhalten des 116 Proteins in säulenchromatographischen Trennungen zu untersuchen und um zu überprüfen, ob 116 mit einer Cofaktor-Aktivität aus Rattenleber Kernextrakt, dem COPRA (Klotzbücher et al., 1997), identisch sein könnte, wurden Western-Analysen biochemisch getrennter Proteinfractionen durchgeführt (Abb. 12). Die Präparation der Rattenleber Kernextrakte sowie ihre biochemische Trennung durch Säulenchromatographie wurden von Fabian Esser durchgeführt. Wie die Analyse zeigt, befindet sich der überwiegende Teil des 116 Proteins nach Trennung des Extraktes durch Phosphocellulose P11 in Fraktion C (600 mM KCl) während ein geringerer Anteil in Fraktion D (1000 mM KCl) eluiert. In einer weiteren Trennung der C-Fraktion durch DEAE-Sepharose wird das 116 Protein in der CA-Fraktion eluiert. Im Gegensatz dazu findet sich COPRA nach Trennung durch Phosphocellulose P11 zwar auch in der C, nach Trennung durch DEAE-Sepharose

jedoch in der CC-Fraktion (Klotzbücher et al., 1997). Die Progesteron-Rezeptor aktivierende Funktion COPRA und 116 sind demnach nicht identisch.

3.8.3 Expression von 116 in verschiedenen humanen Zelllinien

Der polyklonale Antikörper ist mit Hilfe eines Peptides aus dem homologen 116 Protein der Ratte erzeugt worden. Mit Hilfe rekombinanter 116 Proteine konnte gezeigt werden, daß der affinitätsgereinigte Antikörper auch die humane Aminosäuresequenz spezifisch erkennt (nicht gezeigt). Um zu untersuchen, ob der Antikörper in Western Analysen auch das zelluläre, humane Protein erkennen kann, wurden aus unterschiedlichen Zelllinien Ganzzelextrakte untersucht. Diese Analyse sollte gleichzeitig auch Aufschluß darüber geben, in welchen Zelllinien 116 exprimiert ist. Eine Zelllinie, die keine 116 Expression aufweist, würde sich für Funktionsanalysen nach Transfektion besonders eignen, da die Auswirkungen des transient exprimierten 116 Proteins unbeeinflusst vom endogenen Protein bliebe.

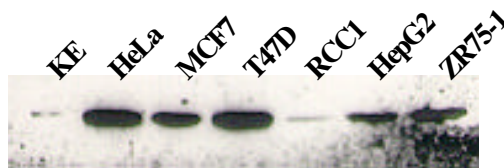


Abb. 13: Nachweis von 116 in humanen Zelllinien

In einer 8% SDS-PAGE wurden 5 µg Rattenleber-Kernextrakt (KE) sowie je 20 µg Ganzzelextrakte der unterschiedlichen humanen Zelllinien getrennt und auf Nitrocellulose übertragen. Der Nachweis des 116 Proteins erfolgte mit dem affinitätsgereinigten Antikörper.

Wie die Western-Analyse in Abb. 13 zeigt, ist der affinitätsgereinigte Antikörper in der Lage, das humane Protein spezifisch nachzuweisen. Das humane Protein besitzt die gleiche Größe wie das homologe Protein der Ratte. In jeder untersuchten Zelllinie wird das 116 Protein exprimiert. Damit wird das Ergebnis einer ubiquitären Expression von 116 erhärtet. Nierencarcinom-Zellen (RCC1) zeigen die vergleichsweise schwächste Expression, lassen sich jedoch nur ungenügend transient transfizieren (nicht gezeigt) und sind daher für Reporteranalysen nicht geeignet. Die ubiquitäre Expression von 116 ließ die Wahrscheinlichkeit gering erscheinen, eine Zelllinie zu finden, die keine 116 Expression aufweist. Spätere Reporteranalysen konnten damit nur in Anwesenheit des endogenen 116 Proteins durchgeführt werden.

3.9 Nachweis von 116 in Rattenuteri

Ein Zielgewebe von Progesteron ist der Uterus. In ihm nimmt der Progesteron-Rezeptor Aufgaben zur Erhaltung der Schwangerschaft wahr. Um zu untersuchen, ob der Progesteron-Rezeptor innerhalb eines autoregulatorischen Mechanismus auch für die Expression seines putativen Cofaktors 116 verantwortlich ist, wurden Ratten ovariectomiert, was die Ausschüttung von Progesteron unterbindet. Zielgene des Progesteron-Rezeptors sollten zumindest teilweise in ihrer Expression gehemmt sein. Western-Analysen von Extrakten aus diesen Uteri sollten zeigen, ob 116 im Vergleich zu Ratten, die nach Entfernen des Ovars mit Progesteron behandelt worden sind, unterschiedlich exprimiert wird. Die Extrakte aus den behandelten wie den unbehandelten Rattenuteri wurden von Lothar Vaßen zur Verfügung gestellt.

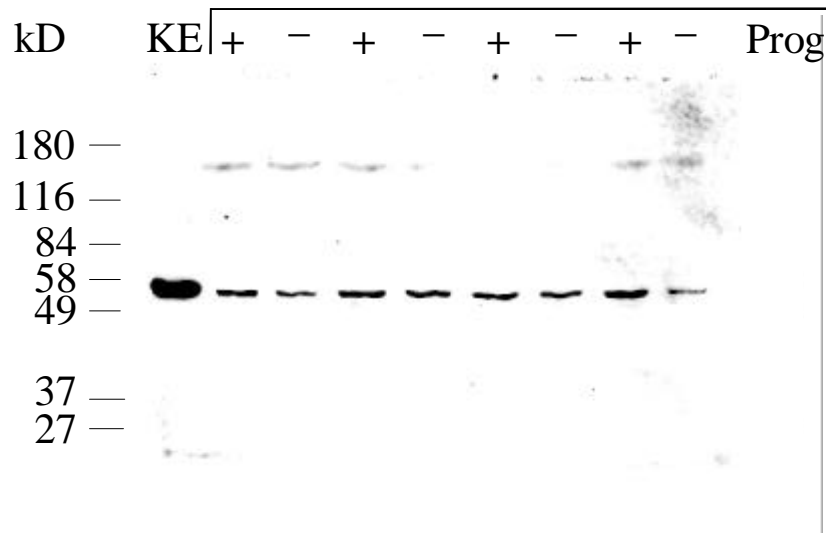


Abb. 14: Western-Analyse: Nachweis von 116 in Uteri ovariectomierter Ratten

Eingesetzt wurden Uterus-Extrakte Progesteron behandelter (+Prog.) bzw. unbehandelter (-Prog.) ovariectomierter Ratten. Als Vergleich diente Rattenleber Kernextrakt (KE). Der Nachweis erfolgte mit affinitätsgerinigtem anti-r116-Antikörper

Die Analyse in Abb. 14 zeigt die Untersuchung von acht ovariectomierten Ratten, wovon vier Progesteron behandelt waren. In allen untersuchten Extrakten ist das Signal für das 116 Protein zu erkennen. Abgesehen von geringen Schwankungen ist jedoch keine signifikante Reduktion der Expression des 116 Gens durch Ovariectomie zu beobachten. Die Expression von 116 ist demnach wahrscheinlich nicht unter der Kontrolle von Progesteron.

3.10 Bestimmung der subzellulären Lokalisation von 116

Um mittels Immunfluoreszenzanalysen zu untersuchen, in welchem Kompartiment der Zelle 116 lokalisiert ist, wurden zunächst transiente Transfektionen durchgeführt. Dazu wurde ein eukaryontischer Expressionsvektor konstruiert, der unter der Kontrolle des SV40-Promotors die gesamte codierende cDNA des 116 Gens enthielt, mit Ausnahme der 129 bp Insertion und der Codons für die ersten drei Aminosäuren („Variante“ von 116 mit vier Zinkfingermotiven). Zum Nachweis in Immunfluoreszenzanalysen wurde 116 dabei im Leseraten mit fünf „myc“-Epitopen fusioniert. Mit diesem Konstrukt wurden Cos7-Zellen transient transfiziert, die in der Lage sind, diesen Vektor zu replizieren. Der Nachweis des exprimierten Proteins erfolgte über den monoklonalen anti-myc Antikörper 9E10 aus der Maus. Als Zweitantikörper dienten ein FITC und ein Cy3-anti-Maus-IgG Konjugat. Im Gegensatz zu zahlreichen nicht transfizierten Zellen zeigten einige im UV-Licht eine starke Färbung des Cytoplasmas. Das Cytoplasma wurde von stark vernetzten Strukturen durchzogen, die sich an der Außenmembran des Zellkerns zu verstärken schienen. In diesen Zellen war der Zellkern von einer Färbung vollkommen ausgespart. Das rekombinante Protein war demnach eindeutig hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert.

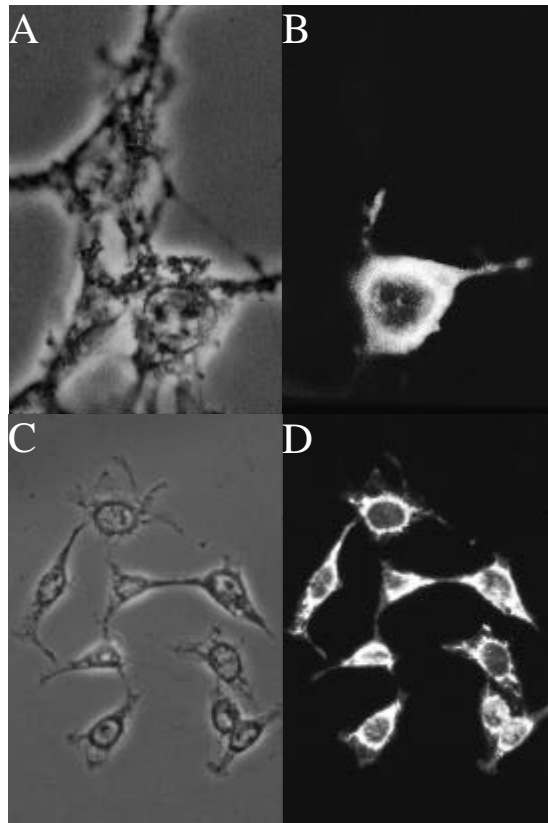


Abb. 15: Subzelluläre Lokalisation von 116

A und B: Mit pSG6-myc116 transient transfizierte COS7 Zellen. Der Nachweis von 116 erfolgte mit dem monoklonalen Mausanti-myc-Antikörper (9E10) und einem FITC-anti-Maus-Antikörper, A: Phasenkontrast, B: Fluoreszenz

C und D: Nicht transfizierte HeLa3B2-Zellen. Der Nachweis des zellulären Proteins erfolgte mit dem affinitätsgereinigten anti 116 Antikörper und einem Cy3-anti-Kaninchen-Antikörper, C: Phasenkontrast, D: Fluoreszenz

Um zu klären, ob sich das natürliche von dem rekombinanten 116 Protein in seiner subzellulären Lokalisation unterscheidet, sollte mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen 116 das endogene Protein nachgewiesen werden (Abb. 15). Gleichzeitig sollte untersucht werden, ob 116 nach Hormonstimulus durch den Progesteron-Rezeptor vom Cytoplasma in den Zellkern transloziert werden kann. Daher wurden die Progesteron-Rezeptor positiven HeLa3B2-Zellen mit R5020 behandelt oder im Vergleich unbehandelt untersucht. Zur Detektion des Erstantikörpers wurde ein entsprechendes Cy3-Antikörperkonjugat eingesetzt. Kontrollen machten deutlich, daß die Färbung der Zellen abhängig von dem affinitätsgereinigten anti 116-Antikörper waren (nicht gezeigt). Auch in diesen Zellen wurde das endogene 116 Protein spezifisch in Cytoplasma lokalisiert, wobei auch hier netzartige Strukturen sichtbar wurden, die sich im Bereich der Zellkernaußenmembran zu verstärken schienen. Das Innere des Zellkerns blieb von einer Färbung jedoch weitgehend ausgespart. Auch die Vorbehandlung mit Hormon hatte keinen Einfluß auf die Lokalisation des 116 Proteins. Die durchgeführten Analysen weisen stark darauf hin, daß das natürliche 116 Protein hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert ist.

3.11 Analyse der *in vitro* Interaktion von 116 mit dem Progesteron-Rezeptor

3.11.1 Untersuchung auf Interaktion zwischen 116 und dem Progesteron-Rezeptor

Als weitere Alternative neben dem Hefe-„two-hybrid“-System, die Interaktion zwischen 116 und dem Progesteron-Rezeptor zu überprüfen, wurden GST-Fusionsprotein Interaktionsanalysen durchgeführt. Ein Fusionsprotein aus GST und dem carboxyterminalen Teil des Progesteron-Rezeptors (AS 456-933) wurde in *E. coli* überexprimiert, an Glutathion-Sepharose immobilisiert und auf Interaktion mit *in vitro* translatierten, radioaktiv markierten 116 Protein untersucht.

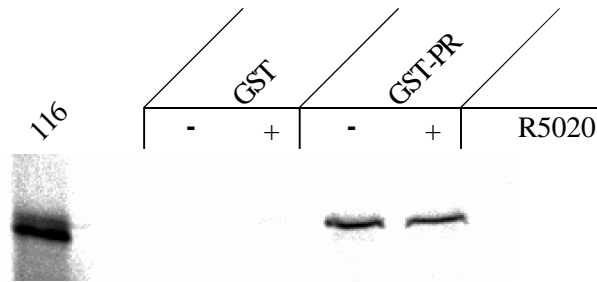


Abb. 16: Interaktion von 116 mit dem Carboxyterminus des Progesteron-Rezeptors

Die Inkubation von ^{35}S -markiertem 116 Protein mit immobilisiertem GST bzw. GST-PR(AS 456-933) erfolgte in An- (+ R5020) oder Abwesenheit (-R5020) von 10^{-6} M R5020. Als Vergleich wurden 5 % des eingesetzten, radioaktiv markierten Proteins (116) aufgetragen.

Die Abb. 16 zeigt, daß 116 in der Lage ist, spezifisch an den carboxyterminalen Teil des Progesteron-Rezeptors zu binden. Dies gelingt weder mit dem immobilisierten GST Protein noch mit Glutathione-Sepharose, die allein mit einem Extrakt aus *E. coli* (mock) inkubiert worden war (s. Abb. 17). Diese Ergebnisse zeigen deutlich die Interaktion zwischen 116 und dem Progesteron-Rezeptor und bestätigen damit die Daten aus den „two-hybrid“ Analysen. Mit Hilfe der GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen konnte jedoch keine Hormonabhängigkeit der Wechselwirkung nachgewiesen werden.

Wie in 3.4 beschrieben, besitzt das 116 Protein eine carboxyterminal gelegene NRBox. Dieses Proteinmotiv ist bei bekannten Coaktivatoren ausreichend für die Interaktion mit den Kern-Rezeptoren (Heery et al., 1997). Um zu untersuchen, ob dieses Motiv auch bei der Interaktion von 116 mit dem Progesteron-Rezeptor entscheidend ist, wurde ein Konstrukt hergestellt, in dem durch Punktmutationen die Aminosäurefolge LNQLL in VNQVV geändert wurde. Der gegenseitige Austausch der kleinen hydrophoben Aminosäuren Leucin und Valin wurde dabei als moderat angesehen. Der Austausch aller drei Leucine sollte jedoch eine vollständige Zerstörung des Proteinmotivs garantieren. Publierte Analysen haben gezeigt, daß bereits ein einzelner Austausch eines Leucins gegen ein Valin eine drastische Reduktion der Interaktion der beteiligten Peptide zur Folge hatte (Heery et al., 1997).

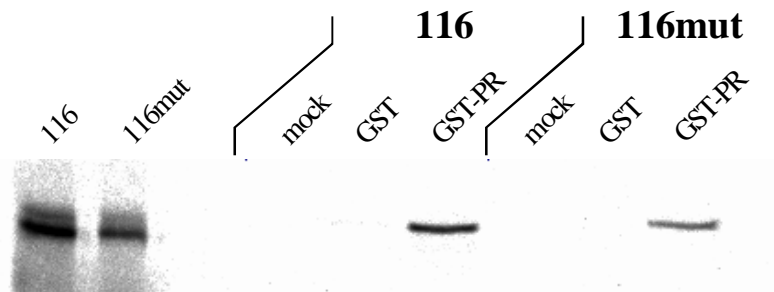


Abb. 17: Interaktion zwischen dem Progesteron-Rezeptor und 116 mit mutierter NR-Box

Das ^{35}S -markierte 116 Protein ohne (116) bzw. mit mutierter NRBox (116mut) wurde mit *E. coli* Extrakt (mock), mit immobilisiertem GST bzw. GSTPR(AS 456-933) inkubiert. Als Vergleich wurden jeweils 5 % des eingesetzten, radioaktiv markierten Proteins (116 bzw. 116mut) aufgetragen.

Abb. 17 zeigt, daß auch die mutierte Form des 116 Proteins in der Lage ist, spezifisch an den carboxyterminalen Teil des Progesteron-Rezeptors zu binden. Normiert auf die Menge an eingesetztem 116 Protein ist die Stärke der Interaktion dabei im Vergleich zum Wildtypprotein nicht reduziert. Das NRBox Motiv des 116 Proteins ist damit nicht entscheidend für die Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor.

3.11.2 Analyse der Interaktionsdomäne des Progesteron-Rezeptors

Um die für die Bindung verantwortlichen Domänen des Progesteron-Rezeptors und des 116 Proteins zu bestimmen, wurden durch Deletionskonstrukte die interagierenden Regionen stärker eingegrenzt. Zunächst wurde der Anteil des Progesteron-Rezeptors verkürzt, der an das GST-Protein fusioniert ist, wobei durch ein zusätzliches Konstrukt auch der N-Terminus des Progesteron-Rezeptors berücksichtigt wurde. Es zeigte sich, daß 116 in der Lage ist, spezifisch an eine Region des Progesteron-Rezeptors zu binden, die fast ausschließlich den zweiten Zinkfinger der DNA Bindungsdomäne enthält. Diese Region von Aminosäure 585 bis 639 des Progesteron-Rezeptors ist somit für die

Interaktion mit 116 ausreichend (s. Abb. 18). Dabei wurde auch überprüft, ob eine zweite, hormonabhängige Interaktionsoberfläche existiert. Jedoch konnte auch in Anwesenheit von 10^6 M R5020 keine Interaktion der carboxyterminalen Ligandenbindungsdomäne mit 116 festgestellt werden (nicht gezeigt).

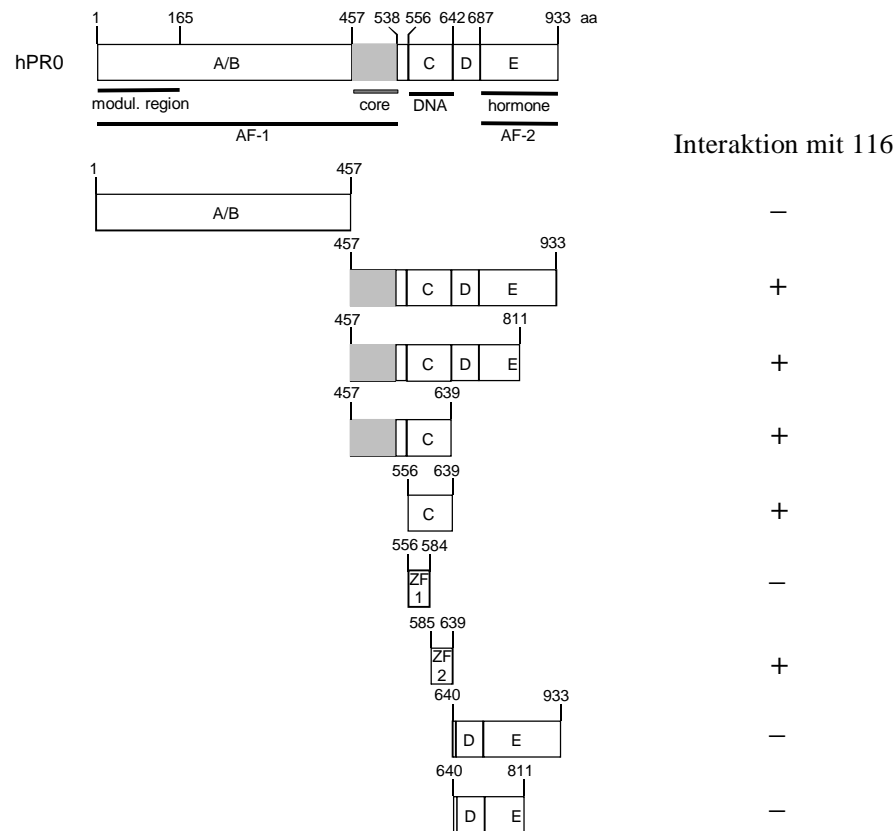


Abb.18: Deletionskonstrukte des Progesteron-Rezeptors zur Bestimmung der Interaktionsdomäne

Gezeigt sind die Domänen des Progesteron-Rezeptors, die aminoterminal mit GST fusioniert in GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen auf Interaktion mit dem vollständigen, radioaktiv markierten 116 Protein untersucht wurden.

3.11.3 Analyse der Interaktionsdomäne von 116

Im Gegenzug wurde das *in vitro* translatierte 116 Protein durch Konstruktion entsprechender Expressionsvektoren im Hinblick auf die Interaktionsdomäne untersucht (s. Abb. 19). Die Aminosäuren bis Position 221 und ab Position 302 sind für eine Interaktion mit dem zweiten Zinkfinger des Progesteron-Rezeptors nicht ausreichend, da die entsprechenden Deletionsproteine nicht wechselwirken. Die interagierenden Proteine besitzen als Gemeinsamkeit die Region von Aminosäure 181 bis 302, die unter anderem das dritte Zinkfingermotiv einschließt. Daher ist diese Domäne für eine Interaktion notwendig.

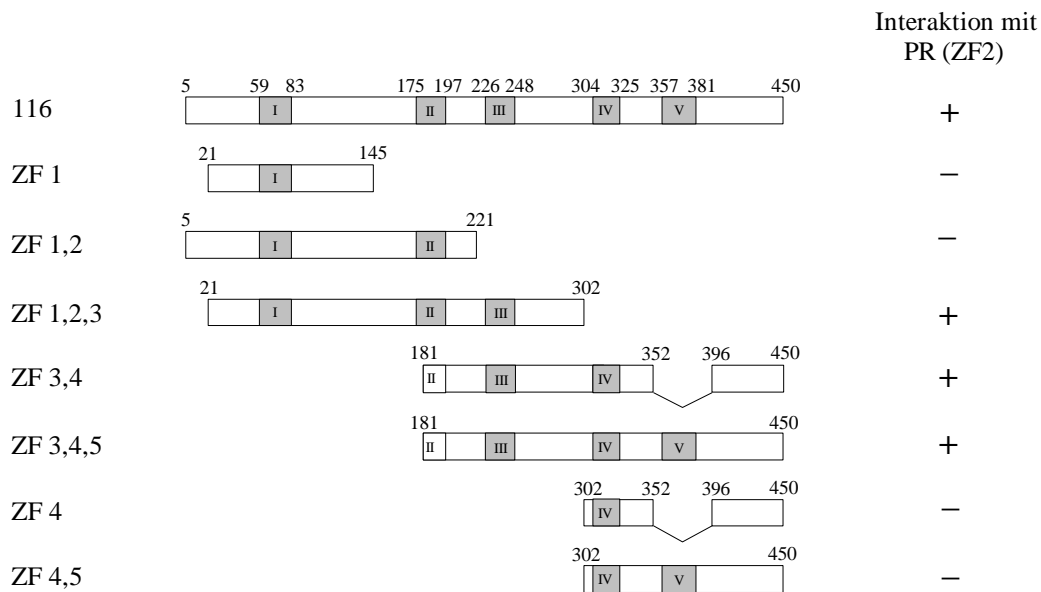


Abb. 19: Deletionskonstrukte von 116 zur Bestimmung der Interaktionsdomäne

Gezeigt sind die Deletionskonstrukte von 116 die nach *in vitro* Transkription/Translation auf Interaktion mit GST-PR(ZF2) (AS 585-639, s. Abb. 18) überprüft wurden.

Die Spezifität von 116 für den Progesteron-Rezeptor wurde überprüft, indem GST-Fusionsproteine generiert wurden, die die DNA-Bindungsdomänen des Östrogen- bzw. Glucocorticoid-Rezeptors enthielten. Das 116 Protein war in beiden Fällen in der Lage, das immobilisierte Protein zu binden (nicht gezeigt). Dies macht deutlich, daß 116 auch andere Steroidhormon-Rezeptoren bindet und keine Spezifität für den Progesteron-Rezeptor vorliegt. Weiterhin sollte auch die Frage geklärt werden, ob 116 zur Dimerisierung in der Lage ist. Dazu wurde ein GST 116-Fusionsprotein auf Interaktion mit einem radioaktiv markierten 116 Protein untersucht. Es zeigte sich, daß für die Dimerisierung des 116 Proteins die gleiche Region verantwortlich ist, wie für die Interaktion mit dem Progesteron Rezeptor (nicht gezeigt). Mit dieser Methode kann jedoch nicht gezeigt werden, ob es sich lediglich um eine Dimerisierung handelt oder ob es zur sogar Ausbildung von Oligomeren kommt.

3.12 Analyse der Interaktionen von 116 in vivo

Mit den GST-Fusionsprotein Interaktionsanalysen konnte gezeigt werden, daß 116 in der Lage ist, an Steroidhormon-Rezeptoren und an sich selbst zu binden. Um zu untersuchen, ob 116 auch befähigt ist, mit anderen Proteinen Komplexe auszubilden, wurden mit dem affinitätsgereinigten Antikörper Coimmunpräzipitationen durchgeführt. Die endogenen Proteine von HeLa-Zellen wurden durch Inkubation mit ³⁵S-Methionin *in vivo* radioaktiv markiert. Mit Hilfe der spezifischen Antikörper wurde das 116 Protein aus Extrakten dieser Zellen an Protein A-Agarose gebunden. Nach Entfernen des größten Teils der unspezifisch gebundenen Peptide wurden die copräzipitierten Proteine durch SDS-PAGE getrennt. Der Vergleich mit der Präzipitation durch einen Antikörper anderer Spezifität sollte Aufschluß über diejenigen Proteine geben, die nicht spezifisch an 116 binden. Die Inkubation der Extrakte nur mit Protein A-Agarose ohne Antikörper sollte Proteine identifizieren, die allein durch die Matrix gebunden werden.

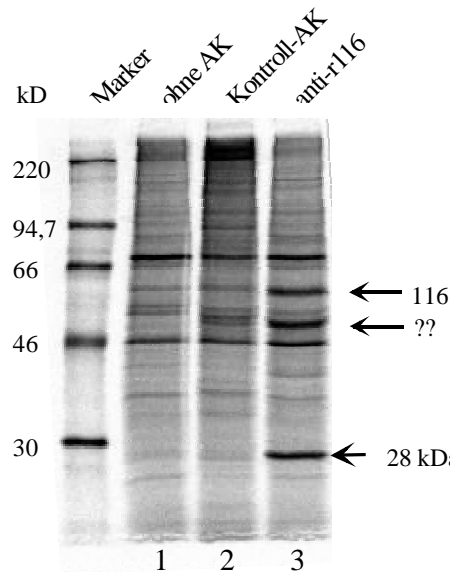


Abb. 20: Coimmunpräzipitation aus HeLa-Zellextrakten

Extrakte aus ^{35}S markierten HeLa-Zellen wurden allein mit der Protein A-Agarose Matrix (ohne AK), mit dem gebundenen polyklonalen Antikörper gegen den Aminoterminal des Progesteron-Rezeptors (unspezif. AK) bzw. mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen r116 (anti-r116) inkubiert. Durch Pfeile markiert sind das zelluläre 116 Protein (116), ein reproduzierbar copräzipitiertes Protein (28 kD) und ein nicht reproduzierbar präzipitierbares Protein (??). Die Detektion der Präzipitate erfolgte im Anschluß an eine SDS-PAGE mit Hilfe des BioImagers BAS1500 (Fuji).

Die in Abb. 20 gezeigte Trennung der *in vivo* markierten und präzipitierten Proteine zeigt deutlich ein Signal für das 116 Protein. Zusätzlich zeigen sich Signale einiger unspezifisch präzipitierter Proteine, sowie ein Signal für ein Protein, das nicht reproduzierbar präzipitiert werden konnte. Mit 116 copräzipitiert reproduzierbar ein etwa 28 kDa großes Protein. Die Identität dieses Proteins konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht festgestellt werden. Um zu untersuchen, ob 116 auch in einer humanen Zelllinie mit dem Progesteron-Rezeptor komplexiert vorliegt, wurden *in vivo* radioaktiv markierte Extrakte aus HeLa3B2-Zellen hergestellt, die im Gegensatz zu HeLa-Zellen den Progesteron-Rezeptor stabil exprimieren. Eine mögliche Hormonabhängigkeit der Interaktion wurde durch vorhergehende Behandlung der Zellen mit bzw. ohne R5020 geprüft. Im Anschluß daran erfolgten die Immunpräzipitationen mit dem affinitätsgereinigten anti-r116 Antikörper bzw. mit einem polyklonalen, affinitätsgereinigten Antikörper gegen die A/B-Domäne des Progesteron-Rezeptors. Als Kontrolle wurden Ansätze ohne Antikörper durchgeführt.

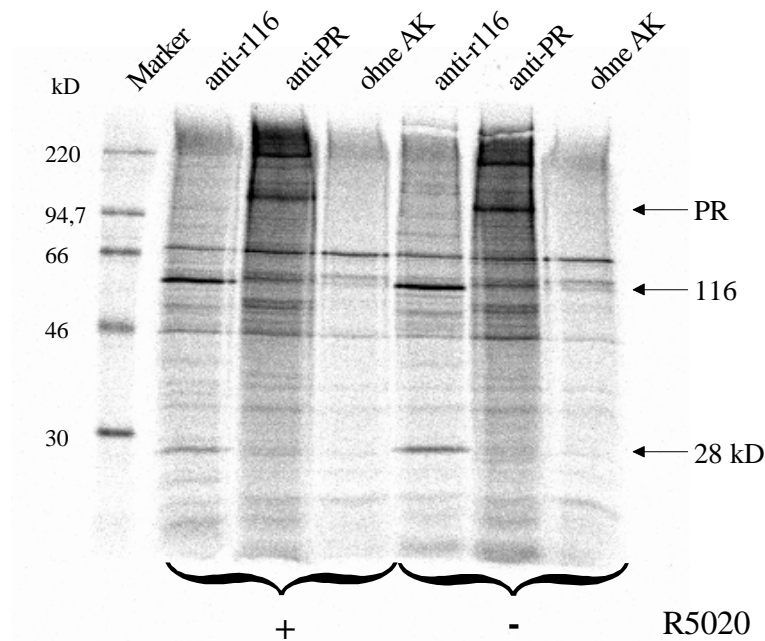


Abb. 21: Immunpräzipitation aus Extrakten *in vivo* markierter HeLa3B2-Zellen

Single Detergenzextrakte ^{35}S markierter, mit 10^{-8} M R5020 behandelter (+) bzw. unbehandelter (-) HeLa3B2-Zellen wurden allein mit der Protein A-Agarose Matrix (ohne AK), mit dem affinitätsgereinigten Antikörper gegen r116 (anti-r116) bzw. mit dem polyklonalen, affinitätsgereinigten Antikörper gegen den Aminoterminus des Progesteron-Rezeptors (anti-PR) inkubiert. Mit Pfeilen markiert sind der Progesteron-Rezeptor (PR), das 116 Protein (116) und das copräzipitierte 28 kD Protein (28 kD).

Die Abb. 21 zeigt bei Präzipitation des 116 Proteins mit dem spezifischen Antikörper wieder das copräzipitierte 28 kD Protein. Auf der Höhe des Progesteron-Rezeptors zeigt sich hingegen kein Signal. Auch die Hormoninduktion bewirkt keine starke Interaktion zwischen dem Progesteron-Rezeptor und 116. Bei Einsatz des gegen den Progesteron-Rezeptor gerichteten Antikörpers ist das Signal für den Rezeptor deutlich zu erkennen. Jedoch kann auf der Höhe des 116 Proteins kein zusätzliches Signal ausgemacht werden. Auch hier zeigt sich durch Hormoninduktion keine Änderung im Hinblick auf eine Interaktion mit dem 116 Protein. Eine intrazelluläre Interaktion zwischen dem 116 Protein und dem Progesteron-Rezeptor konnte demnach auf diese Weise nicht nachgewiesen werden.

3.13 Analyse auf Fähigkeit zur DNA-Bindung von 116

Die translatierte Sequenz des 116 Gens zeigt insgesamt fünf Motive für G-H₂ Zinkfinger. Zahlreiche Proteine binden über Zinkfingerdomänen an Nukleinsäuren. Dies legte die Vermutung nahe, auch 116 könnte in der Lage sein, über die Zinkfinger motive an DNA zu binden. Um diese Vermutung zu überprüfen, wurden DNA Bindungsstudien durchgeführt. Eingesetzt wurde dazu ein doppelsträngiges Oligodesoxyribonukleotid, das intern zwanzig zufällig angeordnete Basenpaare trug, die von kurzen, bekannten Sequenzabschnitten flankiert wurden. Die Mischung dieser zufälligen Oligonukleotide wurde mit dem immobilisierten 116 Protein inkubiert. Dazu wurde das bakteriell exprimierte 116 Protein entweder über einen GST-Fusionsanteil an Glutathion-Sepharose gebunden oder mit Hilfe des affinitätsgereinigten Antikörpers an Protein A-Agarose immobilisiert. Im Anschluß wurden die gebundenen Oligodesoxyribonukleotide isoliert und durch Polymerasekettenreaktion mit Hilfe der bekannten Endsequenzen amplifiziert. Die amplifizierten Sequenzen wurden dann wieder an das immobilisierte Protein gebunden. Es folgten bis zu fünf Wiederholungen der ersten Selektionsrunde. Ziel war die Amplifizierung spezifischer Sequenzen, die an 116 binden können. Als Kontrolle wurden die abschließend amplifizierten Oligodesoxyribonukleotide radioaktiv markiert und in Gelretardationsanalysen mit dem rekombinanten 116 Protein eingesetzt.

War das 116 Protein über einen GST-Anteil immobilisiert, konnte ab der dritten Selektionsrunde mit der Polymerase-Kettenreaktion kein spezifisches Produkt mehr amplifiziert werden. Bei Einsatz des Antikörpers zur Immobilisierung des 116 Proteins wurden Produkte bis zur sechsten Runde amplifiziert. Die Gelretardationsanalyse zeigte jedoch, daß diese Oligonukleotide nicht an das 116 Protein, sondern spezifisch an den eingesetzten

Antikörper binden (nicht gezeigt). demnach war die Selektionsmethode grundsätzlich erfolgreich, es konnten jedoch keine Sequenzen identifiziert werden, die auf eine spezifische DNA-Bindungsaktivität von 116 schließen ließen.

3.14 Untersuchung auf eine interne Aktivierungsfunktion

Coaktivatoren wirken im Zusammenspiel mit den Kern-Rezeptoren auf die basale Transkriptionsmaschinerie. Die DNA-Bindung wird durch den Rezeptor geleistet, während der Coaktivator durch anschließende Rekrutierung an den Rezeptor seine Funktion am Promotor des Zielgens wahrnehmen kann. Es sind Coaktivatoren beschrieben worden, die eine eigene, vom Rezeptor unabhängige Aktivierungsfunktion besitzen (Horset et al., 1996; Li et al., 1997; Voegel et al., 1996). Um zu überprüfen, ob auch 116 in der Lage ist, die Transkription unabhängig vom Rezeptor zu stimulieren, wurde ein eukaryontischer Expressionsvektor konstruiert, der 116 als Fusion mit der DNA-Bindungsdomäne des Gal4-Aktivators exprimiert. In transienten Transfektionen von HeLa-Zellen wurde dieses Konstrukt zusammen mit einem Reportergen exprimiert, das das Luciferasegen in Abhängigkeit vom Thymidin Kinase-Promotor und fünf Gal4-Bindestellen exprimiert. Als Vergleich wurde ein Reporter ohne Gal4-Bindestellen eingesetzt. Wenn 116 eine eigene Aktivierungsfunktion besitzt, kann es die generelle Transkriptionsmaschinerie aktivieren, indem es über die Gal4-DNA-Bindungsdomäne an die Gal4-Bindestellen des Promotors rekrutiert wird. Wie Abb. 22 zeigt, wird im Vergleich zur Transfektion des leeren Expressionsvektors die Aktivität des Reporters durch Expression des Gal4-116-Fusionskonstrukts reduziert. In etwa gleichem Umfang wird die Reporteraktivität jedoch schon durch Expression der Gal4-DNA-Bindungsdomäne allein inhibiert. Dieser Effekt ist demnach nicht spezifisch für die Expression von 116.

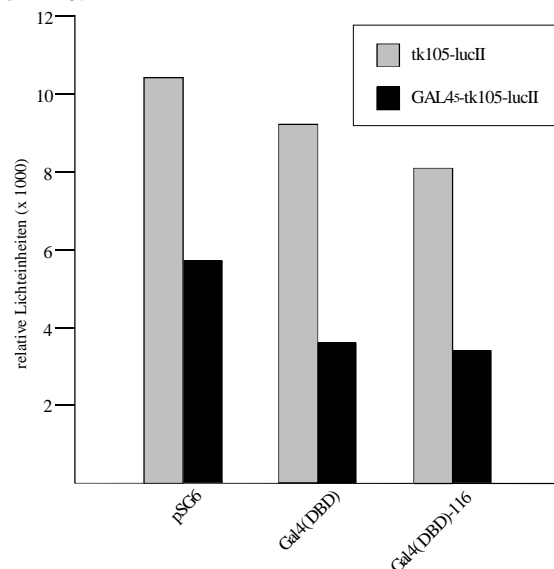


Abb. 22: Untersuchung auf eine funktionelle Aktivierungsfunktion von 116

Cotransfiziert wurde neben den Reporterkonstrukten tk105-lucII und Gal4₅-tk-lucII der leere Expressionsvektor pSG6 bzw. Expressionsvektoren für die Gal4-DNA-Bindungsdomäne (Gal4(DBD)) und die Gal4-DNA-Bindungsdomäne als Fusion mit 116 (Gal4(DBD)-116).

Ein ähnliches Bild zeigt sich auch bei Einsatz des Reporters, dessen Promotor keine Gal4-Bindestellen aufweist. Auch hier kommt es zur Reduktion der Reporteraktivität sowohl durch das 116-Fusionsprotein als auch durch die Gal4-DNA-Bindungsdomäne allein. Da durch das Fehlen der Gal4-Bindestellen die Rekrutierung der transient exprimierten Proteine an den Promotor des Reporters nicht möglich ist, sind die Reduktionen nicht auf einen direkten Einfluß auf die generelle Transkriptionsmaschinerie zurückzuführen. Das 116 Protein besitzt demnach weder eine eigene Aktivierungs- noch Repressionsfunktion.

3.15 Einfluß von 116 auf die Progesteron-Rezeptor Transaktivierung

Der Progesteron-Rezeptor ist in der Lage die Transkription von Zielgenen in Abhängigkeit von Hormon zu aktivieren. An dem Mechanismus der Transaktivierung sollen über den Rezeptor Coaktivatoren beteiligt sein, die die aktivierte Transkription zusätzlich stimulieren. Um zu überprüfen, ob auch 116 die Aktivierung der Transkription durch den Progesteron-Rezeptor verstärken kann, wurden HeLa3B2- oder T47D-Zellen, die den Progesteron-Rezeptor stabil exprimieren, mit einem 116 Expressionsvektor transient transfiziert. Die Aktivierung der Transkription wurde an Hand der Expression Progesteron-Rezeptor responsibler Reportergene gemessen. Zum einen wurde ein Reporterkonstrukt eingesetzt, in dem das Luciferasegen unter der Kontrolle des Thymidin Kinase Promotors mit zwei oder vier Progesteron-Rezeptor-Bindestellen steht, zum anderen wurde die Luciferase in Abhängigkeit vom Progesteron-Rezeptor responsiblen MMTV-Promotor exprimiert.

Der größte Einfluß des Coaktivators auf die Transaktivierung sollte erzielt werden können, wenn auch der Progesteron-Rezeptor in Folge der Hormoninduktion seine größte Aktivität besitzt. Um den Zeitpunkt der stärksten Transaktivierung der Reportergene festzulegen, wurden Zeitkinetiken von beiden Reportern in beiden Zelllinien aufgenommen. Dazu wurden die Zellen zu unterschiedlichen Zeiten nach Transfektion der Reporterkonstrukte mit dem Hormon stimuliert und gemeinsam geerntet, um Verfälschungen der Ergebnisse durch Zellproliferation auszuschließen. Die Abb. 23 zeigt, daß in beiden Zelllinien die Aktivität des MMTV-Reportergens bis etwa 24 Stunden steigt. Der PRE₂-tk-luc-Reporter erreicht dagegen in HeLa3B2-Zellen nach etwa 8 Stunden ein Maximum, um danach wieder abzufallen. In T47D-Zellen erreicht die Aktivität des PRE₂-tk-luc-Reporter nach etwa 12 Stunden einen Maximalwert und fällt anschließend, jedoch nur sehr leicht, wieder ab.

Im Anschluß an die Kinetiken sollte nun der Einfluß von 116 auf die Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor untersucht werden. Ein Konstrukt, das - abgesehen von den ersten drei Aminosäuren - die vollständige 116 Sequenz unter der Kontrolle des SV40-Promotors exprimiert, wurde mit einem der Reporter in die Zellen cotransfiziert. Der Anteil des 116-Expressionsplasmids an der GesamtdNA wurde in aufeinanderfolgenden Transfektionsansätzen schrittweise erhöht. Im Anschluß erfolgte die Hormoninduktion für die Zeit, nach der der jeweilige Reporter an Hand der durchgeführten Kinetiken die maximale Transkriptionsaktivität zeigt. Die Erhöhung der 116 Konzentration bewirkte eine Reduktion der Reporterogenaktivität um 30% auf 70 % des Kontrollansatzes (nicht gezeigt). Dieses Ergebnis war für alle Kombinationen der beiden Zelllinien und der beiden Reportergene reproduzierbar.

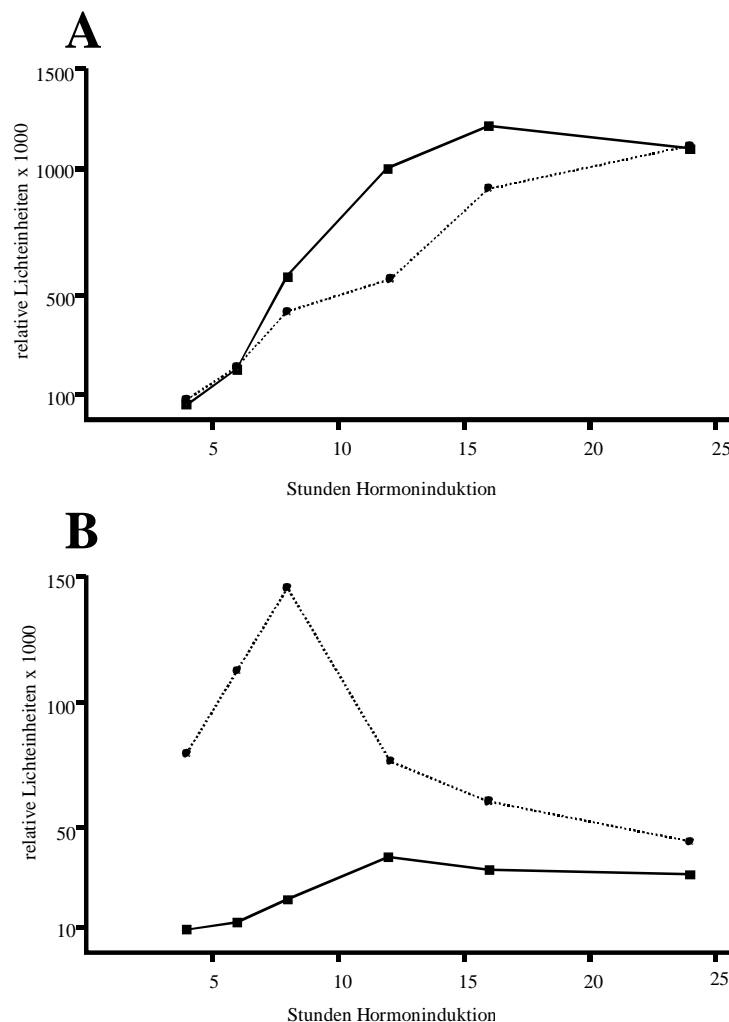


Abb. 23: Zeitkinetiken der hormonabhängigen Transaktivierung

Transiente Transfektion von HeLa3B2-Zellen (● —) und T47D-Zellen (■ —) mit
A: MMTV-luc, B: PRE₂-tk-luc. Die Stimulierung erfolgte mit 10^8 M R5020 für die angegebenen Zeiten. Die Zellen wurden 30 Stunden nach Transfektion geerntet.

Auf Grund relativ großen Streuungen der Meßwerte mußte die Inhibierung der Transaktivierung durch 116 von lediglich 30% durch aufwendigere Transfektionen statistisch abgesichert werden. Zum anderen sollte untersucht werden, ob die Reduktion der Reporterogenaktivität nicht auf die Art der Durchführung der Analyse zurückzuführen sein könnte. So ist das 116-Expressionsplasmid durch die inserierte 116 cDNA um etwa 30% größer als der leere

Vektor. Bei Austausch der gleichen GrammMenge an leerem Vektor gegen das Expressionsplasmid setzt man daher etwa 30% weniger Plasmidmoleküle, und damit auch SV40Promotoren, im Transfektionsansatz ein. Um auszuschließen, daß die Inhibierung der Transaktivierung durch den geringeren Anteil an Plasmiden bzw. an SV40 Promotoren verursacht wird, wurden auch Transfektionen durchgeführt, in deren Ansätzen die Molzahl an leerem Expressionsvektor derjenigen des 116-Expressionsplasmids angeglichen waren. Die DNAGesamtmenge wurde in diesem Fall mit einem Vektor ohne eukaryontischen Promotor ausgeglichen.

Die Abb. 24 zeigt, daß die Expression von 116 zu einer Reduktion der Reporterogenaktivität um etwa 20 % führt. Die Streuung der Mittelwerte überlappt dabei nicht, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Reduktion nicht auf statistische Schwankungen zurückzuführen ist. Jedoch war es nicht möglich, mit dem Vollängen 116 Protein einen noch größeren Effekt auf die Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor zu erzielen. Dies kann auf den Einfluß des endogenen 116 Proteins zurückzuführen sein, das in WesternAnalysen in diesen Zelllinien deutlich nachgewiesen werden konnte (s. Abb. 13).

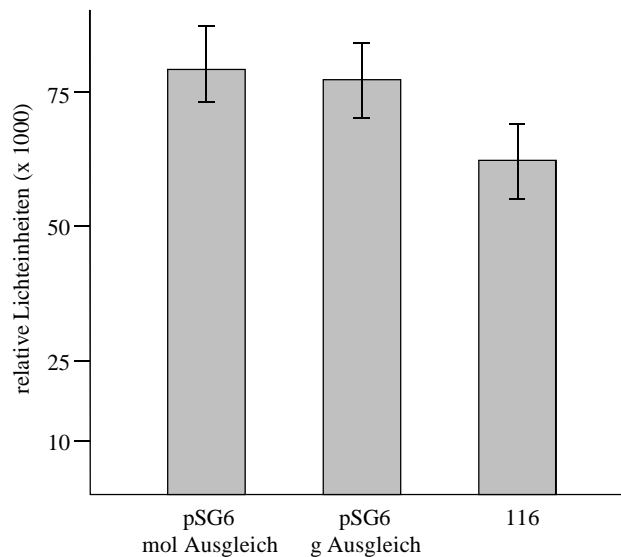


Abb. 24: Transiente Transfektion von T47D-Zellen

Cotransfiziert wurde neben dem Reporter MMTV-luc das pSG6-myc116 (116; Pos. 11 - 1693 ohne Pos. 1056 - 1184) bzw. die gleiche Molzahl (mol Ausgleich) oder die gleiche Grammzahl (g Ausgleich) an pSG6. Die Hormoninduktion mit 10^8 M R5020 erfolgte für 24 Stunden.

Um das endogene Protein auszuschalten und deutlichere Effekte beobachten zu können, wurde daher versucht, eine dominant-negative Form des 116 herzustellen. Die GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen legten die Interaktionsoberfläche des 116 Proteins mit dem Progesteron-Rezeptor offen. Wird nur die Interaktionsoberfläche transient exprimiert, sollte der Progesteron-Rezeptor für das endogene Protein zumindest teilweise unzugänglich werden. Die Funktion des Cofaktors bezüglich der Transaktivierung wäre somit gestört und der Einfluß auf die Reporterogenaktivität verstärkt. Zu diesem Zweck wurden unterschiedliche Expressionsvektoren konstruiert. Zwei der Konstrukte beinhalteten die Interaktionsoberfläche, während zwei weitere die N-terminale bzw. C-terminale Region exprimierten. In transienten Cotransfektionen wurde der Einfluß dieser Konstrukte auf die hormonabhängige Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor untersucht. Die Abb. 25 zeigt, daß sich alle eingesetzten Konstrukte auf die Hormon induzierte Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor auswirken, und zwar bewirkt ein Konstrukt (pSG6-[ZF2,3]) eine leichte Erhöhung und die übrigen drei Konstrukte eine leichte Reduktion der Reporterogenaktivität im Vergleich zum Kontrollansatz. Jedoch sind diese Effekte auch mit einem Reporterkonstrukt zu beobachten, das keine Bindestellen für den Progesteron-Rezeptor besitzt. Der Einfluß der unterschiedlichen Domänen des 116 Proteins ist also nicht spezifisch für die Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor. Es konnte somit im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der verwendeten Testsysteme keine Beteiligung des 116 Proteins an der Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor festgestellt werden.

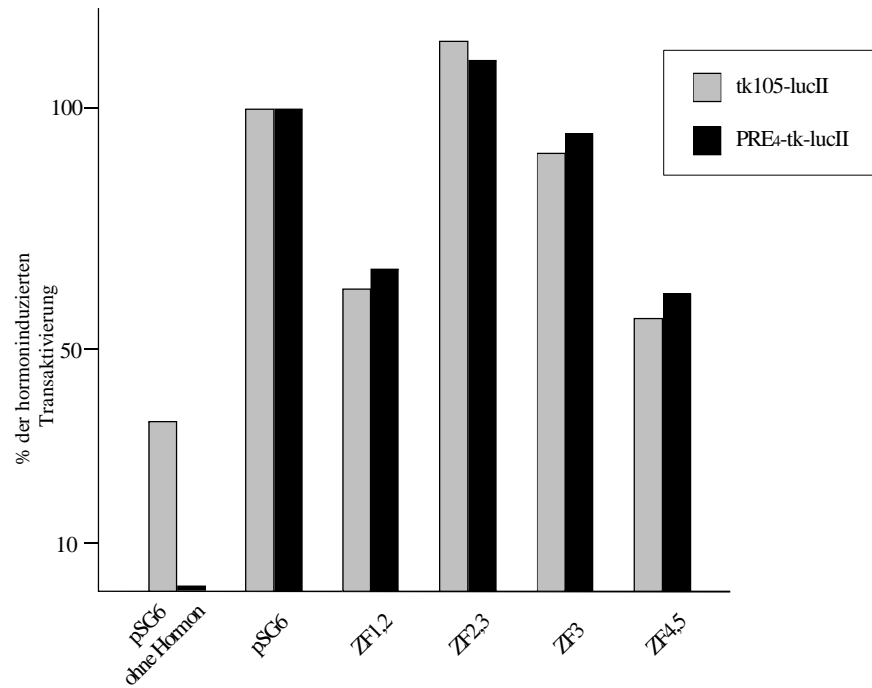


Abb.25: Einfluß von 116 Deletionskonstrukten auf die Progesteron-Rezeptor vermittelte Transaktivierung

HeLa3B2-Zellen wurden in Doppelansätzen mit den angegebenen Reportern und den Expressionsvektoren pSG6-116[ZF1,2] (Pos. 11 - 561), pSG6-116[ZF2,3] (Pos. 556 - 907), pSG6-116[ZF3] (Pos. 902 - 1360 ohne Pos. 1056 - 1184), pSG6-116[ZF4,5] (Pos. 902 - 1360) oder dem Leervektor pSG6 cotransfiziert. Die Hormonstimulierung für 20 Stunden erfolgte sechs Stunden nach Transfektion mit 10^{-8} M R5020.

DISKUSSION

Die induzierbaren Transkriptionsfaktoren der Steroidhormon-Rezeptor-Familie vermitteln die vielfältigen Effekte der Steroide auf Entwicklung, Reproduktion, Proliferation und Homöostase im Zusammenspiel mit zum Teil unbekannten Cofaktoren (Beato and Sanchez-Pacheco, 1996). In unserer Arbeitsgruppe wurden zwei unbekannte Proteine identifiziert, die auf Grund der Hormonabhängigkeit der Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne des Progesteron-Rezeptors im Hefe-„two-hybrid“-System sehr gute Kandidaten für Cofaktoren der Steroidhormon-Rezeptoren darstellen (Schwerk, 1996). Da es sich dabei um unbekannte Proteine handelte, deren Funktion noch nicht charakterisiert war, wurden sie vorläufig mit 114-2 und 116 bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit sollten diese putativen Cofaktoren insbesondere hinsichtlich der Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor charakterisiert werden.

1 Charakterisierung von 114-2

1.1 Bestimmung der vollständigen codierenden cDNA und Analyse der codierten Proteinmotive von 114-2

Als Ausgangspunkt für diese Arbeit diente die Isolierung zweier cDNA-Sequenzen, die mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems identifiziert werden konnten (Schwerk, 1996). Durch den Einsatz dieser Technik konnten schon zahlreiche Cofaktoren der Steroidhormon-Rezeptoren identifiziert werden (Onate et al., 1995; Zeiner and Gehring, 1995; Hong et al., 1996). Zunächst werden mit diesem System jedoch lediglich Peptide selektioniert, die eine Interaktion mit dem Zielprotein vermitteln können, was dazu führen kann, daß zum Teil partielle cDNA-Sequenzen isoliert werden, die nur die Interaktionsdomäne eines Genprodukts codieren. Beispielsweise wurde bei der Identifizierung des Cofaktors SRC-1 mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems nur eine partielle cDNA-Sequenz isoliert, die eine Domäne codiert, welche zwar ausreichend für eine Interaktion mit der Ligandenbindungsdomäne des Progesteron-Rezeptors ist, der jedoch notwendige funktionelle Domänen für eine Stimulierung der Transaktivierung durch den Rezeptor fehlen (Onate et al., 1995). Später fanden sich in zusätzlichen aminoterminalen Sequenzen von SRC1 die für die stimulierte Transaktivierung notwendigen funktionellen Domänen sowie Strukturmodule für eine bHLH-Domäne („basic Helix-Loop-Helix“), die auf eine mögliche intrinsische DNA-Bindungsaktivität hindeutet, und eine PAS-Domäne, die eine Homo- oder Heterodimerisierung vermitteln könnte (Takeshita et al., 1996; Kamei et al., 1996; Yao et al., 1996). Somit eröffnet erst die vollständige codierende cDNA und damit die Kenntnis aller Domänen des Proteins die Möglichkeit einer umfassenden Charakterisierung im Hinblick auf die Funktion.

Auch die cDNA-Sequenz von 114-2 wurde mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems nur partiell isoliert (Schwerk, 1996) und codiert daher möglicherweise ebenfalls nur die Bereiche, die für die Bindung an den Progesteron-Rezeptor ausreichend sind, während weitere, funktionell wichtige Sequenzen fehlen könnten. Für eine Charakterisierung des Proteins war die Isolierung der vollständigen codierenden Sequenz demnach notwendig. Im Rahmen dieser Arbeit konnte die cDNA-Sequenz von 114-2 bis zu einer Länge von etwa 6 kb ermittelt werden (s. Ergebnisse 2.1). Das 3'-Ende der codierenden Region ist durch Stopcodons in allendrei Leserahmen und zwei potentielle Polyadenylierungssignale gekennzeichnet (s. Abb. 1). Am 5'-Ende der Sequenz findet sich vor dem Codon des Startmethionins ein Stopcodon im gleichen Leserahmen. *In vitro* Transkription/Translation dieser cDNA-Sequenz führt zu einem Protein in der erwarteten Größe von ca. 195 kD (s. Ergebnisse 2.2), was die Funktionalität sowohl des Translationsstarts als auch des Stopsignals dokumentiert. Zusammengefasst ist demnach mit großer Wahrscheinlichkeit die codierende cDNA-Sequenz von 114-2 vollständig bestimmt worden. Übersetzt in die Aminosäuresequenz zeigen sich keine Übereinstimmungen zu bekannten Proteinen oder komplexen Proteinmotiven, die auf eine Funktion des 114-2 Proteins schließen ließen. Auffällig sind dagegen fünf voneinander unabhängigen Kernlokalisationssignale, die eine nukleäre Lokalisation des Proteins sehr wahrscheinlich machen (s. Abb. 1). Eine Kernlokalisation des 114-2 Proteins würde gut mit der vermuteten Beteiligung als Cofaktor der durch den Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung korrelieren, da auch der Progesteron-Rezeptor hauptsächlich schon in Abwesenheit von Hormon im Zellkern zu finden ist (Elashry-Stowers et al., 1988; Kahmann et al., 1998). Übereinstimmend tragen auch bereits charakterisierte Coaktivatoren Kernlokalisationssignale und sind zusätzlich durch Immunfluoreszenzanalysen im Zellkern lokalisiert worden, z. B. RIP140 und Mitglieder der p160-Coaktivator-Familie (Cavailles et al., 1995; Voegel et al., 1996; Yao et al., 1996). Um ebenfalls durch Immunfluoreszenzanalysen die Hinweise auf eine Kernlokalisation des zellulären 114-2 Proteins zu erhärten, erscheint die Empfindlichkeit des für 114-2 spezifischen Antikörpers zu gering zu sein (s. Ergebnisse 2.3). Dennoch könnte die Lokalisierung mit Hilfe von Immunfluoreszenzanalysen durch Fusion der 114-

2 Sequenz an eine spezifische Antigen determinante mit dem entsprechenden Antikörper untersucht werden. Davon unabhängig könnte zusätzlich die Funktionalität der Kernlokalisierungssignale durch Fusion mit GFP („grün fluoreszierendes Protein“) mittels Lokalisierung der Fluoreszenz überprüft werden.

Abgesehen von den Kernlokalisierungssignalen zeigt 1142 eine putative Tyrosinkinase-Phosphorylierungsstelle. Phosphorylierung von Proteinen ist eine lange bekannte, wichtige Modifikation zur Kontrolle von Protein Funktionen. Möglicherweise vermittelt dieses Motiv auch im Fall von 114-2 eine Regulation der Funktion des Proteins. Um zu überprüfen, ob das Protein an dieser Stelle phosphoryliert wird, könnte 1142 nach transienter Transfektion in Anwesenheit von radioaktivem Orthophosphat in Zellen exprimiert und durch Immunpräzipitation aus Extrakten dieser Zellen isoliert werden. Eine *in vivo* Phosphorylierung von 114-2 wäre an Hand der radioaktiven Markierung des Proteins nachgewiesen. Für diese Immunpräzipitation wäre entweder ein 114-2 spezifischer Antikörper notwendig oder ein Antikörper gegen ein bestimmtes Peptid („tag“), das zuvor der Sequenz von 1142 zugefügt wurde. Ähnliche Experimente wurden durchgeführt, um die Phosphorylierung des Progesteron-Rezeptors zu untersuchen (Kahmann et al., 1998). Aufgabe der Phosphorylierung könnte im Fall von 1142 z. B. die Regulation einer bisher nicht entdeckten Enzymaktivität sein. Eine Phosphorylierung könnte auch die Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor beeinflussen. So ist beispielsweise gezeigt worden, daß nach Phosphorylierung des Östrogen-Rezeptors SRC-1 an die AF-1 rekrutiert und umgekehrt durch Dephosphorylierung die Interaktion von RAP46 mit Transkriptionsfaktoren stimuliert wird (s. Einleitung Tremblay et al., 1999; Zeiner et al., 1997). Eine Phosphorylierung an dieser spezifischen Stelle wäre demnach ein interessantes Charakteristikum des 114-2 Proteins.

1.2 Interaktion zwischen 114-2 und dem Progesteron-Rezeptor

Mit Hilfe des Hefe-„two-hybrid“-Systems konnte eine Interaktion zwischen 1142 und dem Progesteron-Rezeptor gezeigt werden, die strikt hormonabhängig erfolgt (Schwerk, 1996). Jedoch konnte in den durchgeführten *in vitro* Interaktionsanalysen dieses Ergebnis nicht bestätigt werden (s. Ergebnisse 2.5). Auf Grund der *in vitro* Untersuchungen ist eine Interaktion zwischen 1142 und dem Progesteron-Rezeptor dennoch nicht auszuschließen, da nicht feststellbar ist, ob tatsächlich zellulär keine Wechselwirkung vorliegt, oder ob der fehlende Nachweis systembedingt auf die eingesetzte Methode zurückzuführen ist. Auch die Interaktion zwischen dem Koaktivator UTF1 und dem Transkriptionsfaktor ATF2 konnte systembedingt zunächst nicht bestätigt werden, und erst Modifikationen in der Versuchsanordnung führten zu dem gewünschten Ergebnis (Okuda et al., 1998). Bezogen auf 114-2 könnte beispielsweise die Interaktion im Hefe-„two-hybrid“-System durch Konstruktion reziproker Fusionsproteine der Progesteron-Rezeptor Domäne und des 114-2 Proteins mit der Gal4-DNA-Bindungsdomäne bzw. der -Aktivierungsdomäne nochmals überprüft werden. Auch Coimmunpräzipitationen mit Hilfe eines geeigneten Antikörpers oder der Einsatz eines „twohybrid“-Systems in Säuger-Zellen könnten dazu beitragen, die Frage der Interaktion zwischen 1142 und dem Progesteron-Rezeptor eindeutig zu klären.

1.3 Einfluß von 114-2 auf die Progesteron-Rezeptor vermittelte Transaktivierung

Durch die Interaktion mit den Kern-Rezeptoren konnte ein funktioneller Einfluß auf die Transkription nicht nur für SRC-1, sondern auch für TIF2/GRIP1, TRIP230, ARA70 und andere Koaktivatoren gezeigt werden (Onate et al., 1995; Voegel et al., 1996; Voegel et al., 1998; Hong et al., 1997; Chang et al., 1997; Yeh and Chang, 1996). Die Interaktion zwischen 114-2 und dem Progesteron-Rezeptor im Hefe-„two-hybrid“-System ließ daher einen Einfluß von 114-2 auf die Transaktivierung von Progesteron responsiblen Zielgenen vermuten. Daher sollte durch Reporteranalysen die Rolle von 114-2 am Mechanismus der Transaktivierung geklärt werden (s. Ergebnisse 2.6). Um in diesen Analysen sicher zu stellen, daß alle funktionellen Domänen des Proteins verfügbar sind, wurde das vollständige 114-2 Protein nach Transfektion transient exprimiert. Es konnte jedoch kein signifikanter Einfluß auf die Expression des Reportergens beobachtet werden (s. Abb. 4). Obwohl der Nachweis des zellulären Proteins mit Hilfe eines spezifischen Antikörpers noch aussteht (s. Ergebnisse 2.3), ist 1142 möglicherweise in den Zellen bereits in ausreichenden Mengen vorhanden und die zusätzliche transiente Expression kann keinen weiteren Beitrag zur Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor leisten. Gleiches wurde für RIP140 diskutiert, dessen Expression eine nur zweifache Stimulierung der Östrogen-Rezeptor Transaktivierung bewirkt (Cavailles et al., 1995). Um dennoch einen Einfluß von 1142 auf die Transaktivierung beobachten zu können, wurde allein die Domäne überexprimiert, die für die Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor ausreichend ist, also der durch das Hefe-„two-hybrid“-System isolierte Anteil. Die Überexpression dieser Domäne sollte zu einer Sättigung der Bindestellen des Progesteron-Rezeptors für 114-2 führen und den Einfluß des endogenen Proteins auf die Aktivierung der Reporterexpression zumindest teilweise unterbinden. Dieses Experiment ist zuvor bereits erfolgreich mit dem durch das Hefe-„two-hybrid“-System isolierten Anteil von SRC-1 durchgeführt worden und zeigte einen dominant negativen Einfluß auf die durch den Progesteron-Rezeptor vermittelte Transaktivierung (Onate et al., 1995). Dagegen führte die auf diese Weise mit der Teilsequenz von 1142 durchgeführte Analyse weder zu einer Steigerung noch zu einer Reduktion der Reporterexpression (C. Schwerk, unveröffentlicht).

Der fehlende Nachweis einer funktionellen Interaktion zwischen 1142 und dem Progesteron-Rezeptor ist eventuell auf Abwesenheit weiterer Komponenten zurückzuführen. So ist mit Hilfe der Northern-Analysen festgestellt worden, daß 114-2 differentiell in Hoden exprimiert wird (Schwerk, 1996). Möglicherweise stellt daher 114-2, wie ARIP3 (Moilanen et al., 1999), einen gewebespezifischen Coaktivator dar, und eine Coaktivierung durch 114-2 ist damit nur im Zusammenspiel mit ebenfalls gewebespezifisch exprimierten, an der Transkription beteiligten Faktoren möglich. Beispielsweise konnten mittlerweile zwei TBP verwandte Proteine (TBP related factors“, TRF) identifiziert werden, wovon TRF1 gewebespezifisch in neuronalen und in Keimzellen und TRF2 hauptsächlich in Hoden exprimiert wird (Hansen et al., 1997; Rabenstein et al., 1999). In diesen Zielgeweben übernehmen sie wahrscheinlich genspezifisch die Aufgaben von TBP. Für TRF1 ist außerdem die Assoziation mit gewebespezifischen TAFs gezeigt worden. In unterschiedlichen Geweben existieren daher vermutlich für bestimmte Gene eigene Formen der generellen Transkriptionsmaschinerie, die dann auch einen Einfluß gewebespezifischer Cofaktoren auf die Transkription ermöglichen.

Außerdem ist denkbar, daß 114-2 funktionell nicht mit dem Progesteron-Rezeptor, sondern mit dem nahe verwandten Androgen-Rezeptor wechselwirkt, der im Gegensatz zum Progesteron-Rezeptor in Hoden exprimiert wird (Moilanen et al., 1999). Um diese Möglichkeit zu prüfen, müßte die Interaktion zwischen dem Androgen Rezeptor und 114-2 *in vitro* oder mit Hilfe eines „two-hybrid“-Systems bestätigt und die Funktionalität der Interaktion nach transienter Transfektion geeigneter Zelllinien in Reporteranalysen gezeigt werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnten allerdings die möglichen Kombinationen an Faktoren und Zelllinien für eine Untersuchung von 114-2 nicht überprüft werden. Es ist daher nicht auszuschließen, daß 1142 auf Grund der eigenen gewebespezifischen Expression an der differentiellen Transaktivierung bestimmter Gene durch einen Steroidhormon-Rezeptor beteiligt ist.

1.4 Das Protein von 114-2 könnte von einer bicistronischen mRNA codiert sein

Neben der gewebespezifischen Expression weist die Northern-Analyse (Schwerk, 1996) zusätzlich noch auf ein weiteres, sehr interessantes Charakteristikum von 1142 hin. Die Größe der exprimierten Transkripte steht nämlich in Diskrepanz zu der Größe der isolierten, codierenden cDNA-Sequenz. Obwohl die Northern-Analyse auf mehrere Transkripte hindeutet, die jeweils Größen von über 10kb aufweisen (Schwerk, 1996), ist es möglicherweise trotzdem gelungen, die gesamte codierende Region von 114-2 zu isolieren und zusätzlich die Sequenzinformation des vollständigen Transkriptes zu ermitteln. Diese Vermutung stützt sich auf die Tatsache, daß das 3'Ende der isolierten cDNA-Sequenz von 114-2 den Aminoterminus des Proteins KIAA0480 codiert (s. Abb. 1). Es werden also beide codierenden Bereiche, derjenige für 1142 und derjenige für KIAA0480, auf einer einzigen, isolierbaren cDNA gefunden. Daraus läßt sich die erstaunliche Vermutung folgern, daß 1142 und KIAA0480 von einer bicistronischen mRNA codiert werden. Die Länge der veröffentlichten cDNA von KIAA0480 beträgt 6111 bp. Mit der cDNA von 114-2 erhält man zusammengekommen eine Länge von etwa 12 kb für die bicistronische mRNA, was sehr gut mit der in der Northern-Analyse (Schwerk, 1996) ermittelten Transkriptgröße korreliert. Der Vergleich mit einer Nukleotid-Datenbank zeigte, daß es sich keinesfalls um eine chimäre Sequenz handeln kann, da ein EST Klon gefunden worden ist, der die Sequenz des Überganges von 1142 in KIAA0480 hundertprozentig bestätigt (s. Ergebnisse 2.1 und Tab. 1). Es ist äußerst unwahrscheinlich den absolut gleichen, artifiziell entstandenen chimären Klon in einer unabhängigen cDNA-Bank aus einem anderen Gewebe zu finden.

Jedoch fehlt beim Vergleich der Nukleotidsequenzen von 1142 und KIAA0480 eine Übereinstimmung zu den ersten 105 bp der veröffentlichten cDNA von KIAA0480. Die Sequenz dieser 105 bp zeigt keine Ähnlichkeit zu bekannten Vektorsequenzen oder bakterieller DNA und gibt daher keinen Hinweis darauf, daß es sich um ein Klonierungsartefakt handeln könnte. Hingegen besitzt die cDNA von KIAA0480 exakt an der Position des Übergangs in die 1142 Sequenz die *consensus* Sequenz einer 3'-Spleißstelle. Dies gibt einen Hinweis darauf, daß der veröffentlichten cDNA-Sequenz von KIAA0480 möglicherweise eine ungespleißte Form zu Grunde liegt. Die codierenden Bereiche der beiden Proteine wären damit von einem Intron getrennt.

Daß es sich tatsächlich um eine bicistronische RNA handelt, könnte in Northern-Analysen mit einer KIAA0480 spezifischen Sonde bestätigt werden, wenn das Expressionsmuster sowie die Verteilung in unterschiedlichen Geweben mit derjenigen von 1142 übereinstimmt. Zudem könnte mittels RTPCR versucht werden, aus humaner RNA ein Produkt zu amplifizieren, das ausgehend von der codierenden Sequenz von 1142 in den codierenden Bereich von KIAA0480 reicht. Ob überhaupt beide Proteine von nur einer RNA korrekt translatiert werden, könnte durch Konstruktion eines Expressionsvektors mit der gesamten Sequenzinformation der bicistronischen RNA unter der Kontrolle eines einzelnen Promotors geklärt werden, indem nach Expression *in vitro* oder nach transienter Transfektion *in vivo* die einzelnen Proteine durch jeweils spezifische Antikörper nachgewiesen werden.

Handelt es sich tatsächlich um eine bicistronische RNA, könnten die Funktionen der beiden codierten Proteine vermutlich eng miteinander verknüpft sein, wie es schon für polycistronische Gene von Viren und Säugern gezeigt werden konnte (Alloul and Sherman, 1999; Reiss et al., 1998; Sloan et al., 1999). Bisher wurde jedoch noch keine Funktion für das Protein von KIAA0480 beschrieben, die eine Vermutung in Hinsicht auf eine Funktion von 1142 zuließe. Umgekehrt könnte aber die Möglichkeit, daß es sich bei 1142 um einen gewebespezifischen Cofaktor der Steroidhormon-Rezeptoren handelt, eine Beteiligung auch von KIAA0480 an der Transkriptionskontrolle bedeuten. Gegebenenfalls handelt es sich bei KIAA0480 um den oder einen der Faktoren, die in den Reporteranalysen für

die coaktivierenden Eigenschaften von 1142 fehlen. Das KIAA0480 Protein bietet damit einen weiteren Ansatzpunkt zur Analyse der Eigenschaften von 1142 als Cofaktor der Steroidhormon-Rezeptor vermittelten Transaktivierung in zukünftigen Untersuchungen.

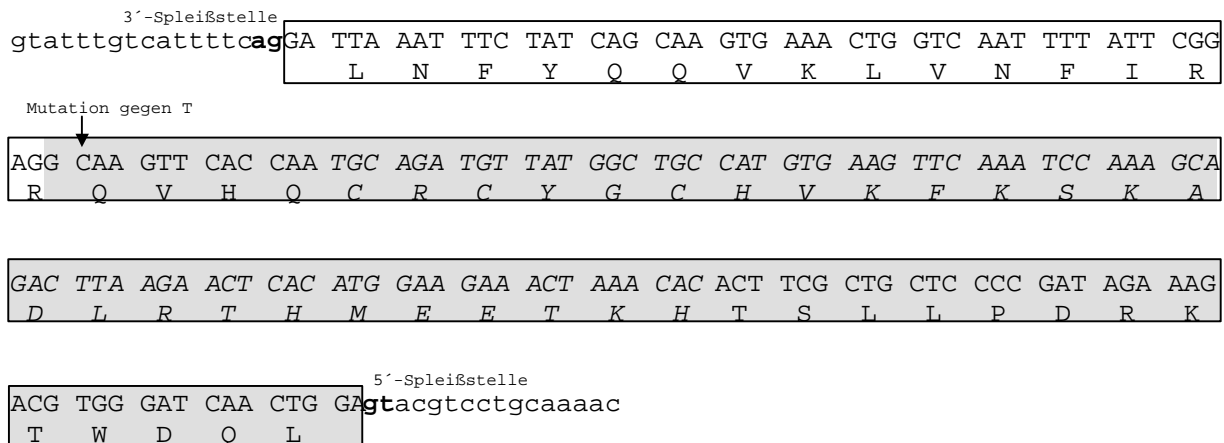
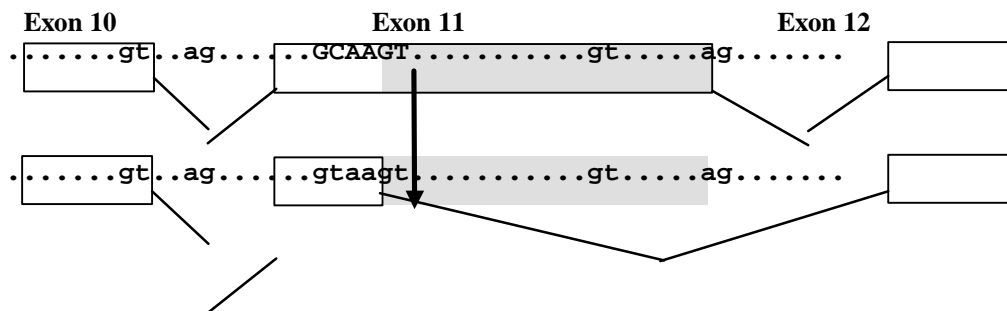
2 Charakterisierung von 116

2.1 Isolierung der vollständigen codierenden 116 cDNA-Sequenz

Als Ausgangspunkt für die Charakterisierung von 116 lag eine sequenzierte cDNA von 1554 bp vor (Schwerk, 1996). Die Primer Extensionsanalyse ließ eine mögliche Verlängerung dieser cDNA in 5-Richtung von etwa 300 bis 330 Nukleotiden vermuten (s. Ergebnisse 3.2). Die nachfolgend durchgeführte RNase Protektionsanalyse zur Bestimmung des Transkriptionsstarts von 116 zeigte dagegen, daß die cDNA stromaufwärts des bekannten Endes mit nur etwa 50 Nukleotiden der genomischen Sequenz überlappt (s. Ergebnisse 3.7). Diese Diskrepanz zwischen der Primer Extension und der Protektionsanalyse könnte möglicherweise auf eine nicht erkannte Spleißstelle von 116 zurückzuführen sein. In diesem Fall würde bei der Protektionsanalyse die Komplementarität der mRNA zur Sonden-RNA, welche der genomischen Sequenz entspricht, an der Spleißstelle abbrechen und müßte zu einem verkürzten RNA-Produkt mit genau definierter Länge führen. Es entstanden jedoch mehrere Produkte geringfügig unterschiedlicher Größe (s. Abb. 6). Außerdem ist in der genomischen Sequenz in dieser Region keine Sequenz zu finden, die einer *consensus* 3'-Spleißstelle (P_{yn} -N-C-A-G | G, wobei | die Spleißstelle beschreibt, Sharp 1985) ähnlich ist, so daß es unwahrscheinlich erscheint, daß eine Spleißstelle nicht erkannt worden ist. Die Ursache für die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden eingesetzten Methoden läßt sich daher nicht klären. Es sprechen jedoch mehrere Hinweise dafür, daß die codierende cDNA von 116 im Rahmen dieser Arbeit vollständig identifiziert werden konnte: Es wurden keine cDNA-Klone isoliert, die übereinstimmend mehr Sequenzinformation besitzen, als den in Abb. 7 gezeigten 5'-Bereich. Auch die homologe cDNA-Sequenz der Ratte reicht nur genau bis zu dem beschriebenen Startcodon der menschlichen Sequenz. Außerdem fehlen unter den zahlreichen, veröffentlichten EST-Sequenzen Klone mit mehr Sequenzinformation in 5-Richtung. Letztlich korrelieren die Größe des Haupttranskripts in der Northern-Analyse mit der cDNA-Sequenz und die Größe des in Western-Analysen nachgewiesenen natürlichen 116 Proteins mit der aus der cDNA vorhergesagten Größe (s. Ergebnisse 3.8). Neben dem 5'-Terminus gehören zur vollständigen cDNA auch die zur ursprünglich bestimmten Sequenz (Schwerk, 1996) zusätzlichen 129 bp, die mit Hilfe der PCR aus einer HeLa-cDNA-Bank isoliert werden konnten (s. Ergebnisse 3.2). Diese 129 bp codieren in dem zuvor ermittelten offenen Leserahmen 43 Aminosäuren, die ein fünftes, *consensus* Zinkfingermotiv darstellen. Zunächst wurde vermutet, daß es sich möglicherweise um eine Spleißvariante von 116 handeln könnte, die einen zusätzlichen Zinkfinger besitzt, da auch schon für einen anderen Coaktivator, nämlich SRC-1, Spleißvarianten beschrieben worden sind (Hayashi et al., 1997). Für 116 konnte dagegen in verschiedenen Ratten-Geweben mit Hilfe einer RNase Protektionsanalyse nur die Expression der längeren Variante mit den fünf potentiellen Zinkfingermotiven nachgewiesen werden (s. Ergebnisse 3.3). Vergleiche mit einer Nukleotid-Datenbank zeigten zudem, daß alle homologen EST-Sequenzen in diesem Bereich die 129 bp besitzen. Auch die isolierte cDNA-Sequenz des Ratten-Homologen (L. Klein-Hitpaß, unveröffentlicht) trägt diese Erweiterung zu der ursprünglich ermittelten humanen Sequenz, so daß zusammengenommen alternatives Spleißen des 116 Gens an dieser Stelle unwahrscheinlich erscheint.

Wenn diese 129 bp aber kein alternatives Exon darstellen, ist ungeklärt, woher die ursprünglich mit Hilfe des Hefe „two-hybrid“-Systems isolierte Form mit den vier Zinkfingermotiven herrührt. Eine mögliche Erklärung konnte an Hand der Exon/Intron-Übergänge, die mit Hilfe der veröffentlichten genomischen Sequenz von 116 bestimmt wurden, entwickelt werden. Beim Vergleich der cDNA mit der genomischen Sequenz stellte sich heraus, daß die 3' Spleißstelle des elften Exons, welche das fünfte Zinkfingermotiv codiert, das 3'-Ende der 129 bp markiert (s. Abb. 28). Das 5'-Ende der zusätzlichen Sequenz stellt dagegen keine Spleißstelle dar. Ausgehend von der genomischen Sequenz ist daher alternatives Spleißen, das genau zu der um die 129 bp verkürzten Version der 116 cDNA führt, mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht möglich. Bei genauerer Betrachtung der cDNA Sequenz erkennt man jedoch, daß der Austausch des Cytidin gegen ein Thymidin an Position 1057 zu einer *consensus* 5'-Spleißstelle (*consensus*: AG | GTAAGT, wobei | die Spleißstelle markiert; Sharp, 1985) führt.

Durch eine einzelne Punktmutation würde daher eine artifizielle Spleißstelle erzeugt, die zur Entstehung der um 129 Nukleotide verkürzten mRNA führen könnte (s. Abb. 28). Ein klassisches Beispiel einer solchen artifiziellen Spleißstelle, die durch eine einzelne Punktmutation im β -Globin-Gen erzeugt wird und zu einem verkürzten Protein führt, stellt die Ursache der β -Thalassämie dar (Spritz et al., 1981). Auf Grund dieses Beispiels scheint die Vermutung nicht unbegründet, daß auch die mit Hilfe des Hefe „two-hybrid“-Systems isolierte cDNA-Sequenz auf eine Mutation des Gens in den zur cDNA-Synthese eingesetzten HeLa-Zellen zurückgehen könnte. Diese Mutation kann aber für HeLa-Zellen nicht charakteristisch sein, da auch die längere Variante von 116 aus einer HeLa-DNA-Bank isoliert worden ist.

A**B****Abb. 26: Das elfte Exon von 116 in der genomischen Sequenz**

Grau unterlegt sind die zusätzlich gefundenen 129 bp. Die Mutation, die zu einer artifiziiellen Spleißstelle führen könnte, ist mit einem Pfeil gekennzeichnet. Umrandet dargestellt sind die jeweiligen Exons. Die Intron-Sequenzen sind durch Kleinbuchstaben gekennzeichnet.

A: Das elfte Exon von 116 mit den flankierenden genomischen Sequenzen. Das fünfte Zinkfingermotiv ist in kursiver Schrift dargestellt.

B: Vermutete Spleißvariation bei Mutation von C nach T an Position 1057, die Ursache der verkürzten Form von 116 sein könnte.

2.2 Konstante ubiquitäre Expression und cytoplasmatische Lokalisation von 116

Die Verteilung in unterschiedlichen Geweben stellt ein wichtiges Charakteristikum eines einzelnen Cofaktors dar, da durch eine Gewebespezifität ein Hinweis auf eine mögliche Beteiligung an der Transaktivierung differentiell exprimierter Gene gegeben sein könnte. So konnte für ARIP3 und UTF1 eine hohe Gewebespezifität gezeigt werden, die in Zusammenhang mit einer Beteiligung an jeweils spezifischen Entwicklungsprozessen gebracht wurde (Moilanen et al., 1999; Okuda et al., 1998). Die gewebespezifische Expression stellt aber offenbar kein generelles Kriterium für einen Coaktivator dar. So wurde beispielsweise für die Coaktivatoren TIF2, SRG1, p/CIP (=RAC3) und ARA 70 (Voegel et al., 1996; Li et al., 1997; Yeh and Chang, 1996) gezeigt, daß sie in den meisten der untersuchten Gewebe exprimiert werden, auch wenn dabei die Unterschiede im Grad der Expression zum Teil sehr groß sind. Für 116 wies die Northern-Analyse unterschiedlicher humaner Gewebe auf eine ubiquitäre Expression hin (Schwerk, 1996). Zudem konnte in Western-Analysen mehrerer humaner Zelllinien (s. Abb. 15) und in RNase Protektionsanalysen verschiedener Ratten-Gewebe gezeigt werden, daß 116 in allen untersuchten Zelllinien und Geweben exprimiert wird (s. Abb. 8). Die Expression von 116 erfolgt dabei nicht nur ubiquitär, zusätzlich wird es beim Vergleich der unterschiedlichsten Gewebe auch noch in immer gleicher Menge exprimiert (s. Abb. 7 und L. Klein-Hitpaß, unveröffentlicht). Die ubiquitäre Expression in konstanter Menge weist darauf hin, daß 116 möglicherweise eine grundlegende Funktion in der Zelle erfüllt. Hinweise auf eine spezielle Funktion von 116 lassen sich aber auf Grund der fehlenden Gewebespezifität nicht erkennen.

Neben der Lokalisation des Proteins in den unterschiedlichen Geweben können Hinweise über eine mögliche Funktion auch über die Lokalisation in der einzelnen Zelle gewonnen werden. Die Coaktivatoren RIP140, TIF2, mSRC-1, SNURF und ARIP3 wurden an Hand von Immunfluoreszenzanalysen ausschließlich im Zellkern lokalisiert (Cavailles et al., 1995; Voegel et al., 1996; Yao et al., 1996; Moilanen et al., 1998; Moilanen et al., 1999). Zusätzlich weisen die Aminosäuresequenzen, z. B. von RIP140 und TIF2, Kernlokalisierungssignale auf (Cavailles et al., 1995; Voegel et al., 1996). Die Lokalisierung korreliert dabei mit der Funktion dieser Proteine als Cofaktoren der Transkription im Zellkern. Im Gegensatz zu diesen als Coaktivatoren charakterisierten Proteinen zeigten Immunfluoreszenzanalysen eindeutig, daß 116 in HeLa-Zellen, sowie nach transienter Transfektion auch in Cos7 Zellen, hauptsächlich cytoplasmatisch lokalisiert ist (s. Ergebnisse 3.10). Außerdem weist auch die Aminosäuresequenz von 116 keine Kernlokalisierungssignale auf. Die subzelluläre Lokalisation kann demnach die Vermutung der Funktion von 116 als putativer Cofaktor der Transaktivierung nicht stützen, widerlegt diese aber auch nicht. An Hand dieser Analysen ist nicht auszuschließen, daß trotzdem geringe Mengen an 116 kernlokalisiert sind, die für eine Funktion bei der Transaktivierung ausreichen.

2.3 Analyse der vielfältigen möglichen Interaktionen von 116

Die cDNA-Sequenz von 116 codiert für insgesamt fünf potentielle C₂-H₂-Zinkfinger motive. Zahlreiche Proteine, so auch die Mitglieder der Steroidhormon-Rezeptorfamilie, binden spezifisch über Zinkfingerdomänen an Nukleinsäuren (Evans, 1988; Alroy and Freedman, 1992). Möglicherweise ist daher auch 116 zur DNA-Bindung fähig und gleicht in diesem Punkt interessanterweise den Coaktivatoren der p160-Familie, die potentiell die Fähigkeit zur DNA-Bindung über eine bHLH-Domäne („basic Helix-Loop-Helix“) besitzen (Chen et al., 1997). Bisher ist die DNA-Bindung von p160 Coaktivatoren noch nicht beschrieben worden und konnte auch für 116 im Rahmen dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden (s. Ergebnisse 3.14). Jedoch ist sie auf Grund der durchgeführten Analysen für das natürliche 116 Protein auch nicht auszuschließen. Für die Untersuchungen ist ausschließlich bakteriell exprimiertes Protein eingesetzt worden, welches DNA möglicherweise wegen unzureichender Faltung nicht binden kann. Andererseits könnte es sich bei 116 wegen der cytoplasmatischen Lokalisation aber auch um ein RNA-bindendes Protein handeln, das aus diesem Grund die eingesetzten Oligodesoxyribonukleotide nicht binden konnte. Der Nachweis einer Bindung an Nukleinsäuren könnte säulenchromatographisch über eine Retardation von 116 an immobilisierter DNA bzw. RNA untersucht werden, wobei das natürliche Protein aus Zellextrakten mit Hilfe des spezifischen Antikörpers (s. Ergebnisse 3.8) nachweisbar wäre. Im Fall einer Wechselwirkung ließe sich mit Hilfe von Deletionskonstrukten die bindende Domäne bestimmen.

Zinkfinger motive sind jedoch nicht ausschließlich für die Bindung von Nukleinsäuren, sondern ebenfalls für Protein-Protein-Interaktionen charakteristisch. So bildet beispielsweise der Transkriptionsfaktor Ikaros einerseits über zwei carboxyterminale C₂-H₂-Zinkfinger Homodimere aus und geht andererseits eine Interaktion mit dem Protein Aiolo ein (Georgopoulos et al., 1997; Sun et al., 1996; Morgan et al., 1997). Gleichzeitig ist Ikaros aber auch in der Lage über vier weitere C₂-H₂-Zinkfinger spezifisch an DNA zu binden. Die Bindung von 116 an Proteine konnte im Rahmen dieser Arbeit bereits mit den durchgeführten Coimmunpräzipitationen und GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen nachgewiesen werden (s. Ergebnisse 3.12 und 3.13). Letztere zeigen speziell die Wechselwirkung mit dem Progesteron-Rezeptor und bestätigen damit gleichzeitig das Ergebnis der Hefe, two-hybrid-Experimente (Schwerk, 1996). Außerdem konnte über Deletionskonstrukte von 116 die Interaktion auf einen Bereich eingegrenzt werden, der eines der beiden consensus C₂-H₂-Zinkfinger motive einschließt (s. Abb. 19). Der putative Zinkfinger ist daher möglicherweise an der Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor beteiligt. Einschränkend muß gesagt werden, daß auch eine andere Region dieses Bereiches die Interaktion vermitteln könnte. Weitere Deletionen dieser Domäne sind notwendig, um diese Frage eindeutig zu klären. Daß diese zentrale Region von 116 eine Interaktion mit dem Rezeptor vermittelt, war aber überraschend. Zuvor wurde nämlich für Coaktivatoren gezeigt, daß ein kurzes, konserviertes Motiv ausreichend ist, an transkriptionell aktive Kern-Rezeptoren zu binden (Heery et al., 1997). Die Aminosäuresequenz von 116 besitzt ebenfalls ein solches Motiv, aber nicht zentral im Protein, sondern am Carboxyterminus (s. Abb. 7). Dieses Motiv wird durch die Aminosäuren LXXLL beschrieben und als NR-Box („nuclear receptor box“), LXD („LXXLL domain“) oder NID („nuclear receptor interacting domain“) bezeichnet. 116 bindet zwar *in vitro* an den Rezeptor (s. Ergebnisse 3.12), jedoch ist die NR-Box von 116 für diese Interaktion nicht notwendig (s. Abb. 19).

Die Spezifität einer NR-Box hinsichtlich der Bindung an verschiedene Kern-Rezeptoren wird durch Aminosäuren entscheidend mitbestimmt, die carboxyterminal zum Kernmotiv liegen (McInerney et al., 1998). Da die NR-Box direkt am Carboxyterminus von 116 liegt und somit keine carboxyterminal zum Kernmotiv liegenden Aminosäuren vorhanden sind, ist es denkbar, daß sie aus diesem Grund nicht funktionell ist. Allerdings besitzt auch eine Spleißvariante von SRC-1 eine NR-Box direkt am Carboxyterminus, die für eine ligandenabhängige Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor und dem Östrogen-Rezeptor ausreichend ist (Onate et al., 1995; Heery et al., 1997). Die Wechselwirkung erfolgt, indem die NR-Box, für die eine helikale Konformation angenommen wird, in eine hydrophobe Tasche in der Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors bindet (Feng et al., 1998; Torchia et al., 1997; Darimont et al., 1998). Die *in vitro* Interaktionsanalysen zeigten eine Wechselwirkung von 116 mit dem Progesteron-Rezeptor, an der die DNA-Bindungsdomäne und nicht die Ligandenbindungsdomäne beteiligt ist. Es ist

daher keine hydrophobe Tasche vorhanden (s. Abb. 19), was wahrscheinlich erklärt, daß die NRBox für diese Interaktion nicht benötigt wird.

Die Bedeutung der DNA-Bindungsdomäne von Kern-Rezeptoren als Interaktionsoberfläche transkriptionsaktiver Proteine hat stark zugenommen. So konnte gezeigt werden, daß der Progesteron-Rezeptor über seine DNA-Bindungsdomäne mit dTAH110 wechselwirkt (Schwerk et al., 1995) und der Glucocorticoid-Rezeptor über seine C-Domäne mit dem Transkriptionsfaktor HNF6 interagiert (Lemaigre, pers. Mtlg.). Der Coaktivator PCAF bindet hormonabhängig an die DNA-Bindungsdomäne verschiedener Kernrezeptoren (Blanco et al., 1998) und der differentiell exprimierte Cofaktor ARIP3 interagiert mit der DNA-Bindungsdomäne des Androgen-Rezeptors (Moilanen et al., 1999). Für die Interaktion mit 116 ist die Region des zweiten Zinkfingers der DNA-Bindungsdomäne des Progesteron-Rezeptors ausreichend (AS-Pos. 585 bis 639, s. Abb. 20). Zunächst steht dies scheinbar im Gegensatz zu den Ergebnissen der Hefe„two-hybrid“-Analysen, da dort für die Interaktion mit 116 ein Konstrukt eingesetzt worden ist, das nicht die DNA-Bindungsdomäne sondern die „hinge“-Region (Domäne D) und die Ligandenbindungsdomäne (AS-Pos. 631 bis 933) des Rezeptors enthielt. Jedoch überlappen die beiden Progesteron-Rezeptor-Konstrukte der Fusionsproteinanalyse auf der einen und des „twohybrid“-Systems auf der anderen Seite in neun Aminosäuren (AS-Pos. 631 bis 639). Ob genau diese neun Aminosäuren notwendig oder sogar ausreichend für die Interaktion des Progesteron-Rezeptors mit 116 sind, könnte an Hand weiterer GST-Fusionsproteine des Rezeptors untersucht werden. Diese Fusionsproteine sollten die Ligandenbindungsdomäne mit bzw. die DNA-Bindungsdomäne ohne diese neun Aminosäuren enthalten und auf eine Interaktion mit 116 überprüft werden. Die Konstruktion entsprechender Expressionsplasmide ist im Rahmen dieser Arbeit bereits erfolgt, die GST-Fusionsproteine konnten jedoch bisher nicht bakteriell überexprimiert werden.

Neben den Wechselwirkungen der Cofaktoren mit den Liganden und den DNA-Bindungsdomänen von Kern-Rezeptoren konnte zusätzlich für SRC-1 auch eine Interaktion mit der phosphorylierten AF-1 des Östrogen-Rezeptors festgestellt werden, die in diesem Fall ligandenunabhängig erfolgt. Jedoch zeigen die meisten bisher charakterisierten Coaktivatoren eine Wechselwirkung mit dem Kern-Rezeptor nur in Anwesenheit eines Liganden. Beispielsweise interagiert sowohl RIP140 mit dem Östrogen-Rezeptor als auch SRC-1 mit dem Progesteron-Rezeptor in Abhängigkeit von Hormon (Cavaillès et al., 1995; Onate et al., 1995). Für SRC-1 konnte die Hormonabhängigkeit der Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor in GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalysen gezeigt werden, wohingegen für GRIP1 (TIF2 Homologes der Maus) mit der gleichen Methode keine strenge Hormonabhängigkeit der Wechselwirkung mit verschiedenen Steroidhormon-Rezeptoren festgestellt werden konnte. Die Autoren begründen dies mit dem Fehlen eines Hitzeschockproteins (Hong et al., 1996). Möglicherweise besitzt ein bakteriell exprimierter Rezeptor tatsächlich wegen fehlender Hilfsproteine bereits die Konformation des aktivierten Zustands. Auf diese Weise wäre auch zu erklären, warum die auf Grund der Hefe„two-hybrid“-Analysen erwartete Hormonabhängigkeit der Interaktion zwischen 116 und dem Progesteron-Rezeptor mit Hilfe der GST-Fusionsprotein-Interaktionsanalyse nicht reproduziert werden konnte (s. Abb. 18).

2.4 Analyse der Transkriptionsregulation durch 116

Charakteristisch für Coaktivatoren ist eine eigene Aktivierungsfunktion, wie sie z. B. für RIP140, p/CIP und TIF2 festgestellt werden konnte (Horset et al., 1996; Li et al., 1997; Voegel et al., 1996). Zur Identifizierung dieser Aktivierungsfunktionen wurden die Cofaktoren durch Fusion an eine heterologe DNA-Bindungsdomäne über die entsprechenden verantwortlichen DNA-Elemente in den proximalen Bereich von Minimalpromotoren rekrutiert. Die Untersuchung des 116 Proteins auf gleiche Weise lieferte keinen Hinweis auf eine eigene Aktivierungsfunktion (s. Abb. 24). Vielmehr konnte bei Expression des 116-Fusionsproteins eine leichte Reduktion der Reporter-genaktivität beobachtet werden. Allerdings wird diese Reduktion ähnlich stark erzielt, wenn die Gal4-DNA-Bindungsdomäne allein exprimiert wird. Sogar die Expression eines Reporterkonstruktes wird reduziert, das auf Grund der fehlenden verantwortlichen Elemente gar keine Bindung der transient exprimierten Proteine ermöglicht. Die Ergebnisse weisen daher darauf hin, daß 116 die basale Transkription weder positiv noch negativ beeinflussen kann und sich damit von den bekannten Cofaktoren der Steroidhormon-Rezeptoren unterscheidet.

Den Beweis für eine Funktion als Cofaktor stellt aber letztlich die zusätzliche Stimulierung bzw. die Repression der durch Kern-Rezeptoren aktivierten Transkription von Zielgenen dar. Um diese Einflüsse analysieren zu können, sind einerseits Untersuchungen mit *in vitro* Transkriptionssystemen (Klotzbücher et al., 1997; Pfitzner et al., 1993) und andererseits mittels Reporter-genanalysen nach transienter Transfektion durchgeführt worden (Torchia et al., 1997; Voegel et al., 1996; Onate et al., 1995; Feng et al., 1998; Chen et al., 1997). Auch der Einfluß von 116 auf die Progesteron-Rezeptor vermittelte Transaktivierung wurde daher an Hand transiente Reporter-genanalysen untersucht. Dazu wurden Zellen (T47D und HeLa3B2) eingesetzt, die den Progesteron-Rezeptor bereits stabil exprimieren. Western-Analysen zeigten, daß 116 sowohl in HeLa wie auch in T47D-Zellen exprimiert ist (s. Abb. 15). Die Reporter-genanalysen wurden daher immer in Anwesenheit des endogenen Proteins durchgeführt. Wurde das vollständige 116 Protein transient exprimiert, konnte ein leichter repressorischer Effekt beobachtet werden (s. Abb. 25). Dieser negative Einfluß könnte darauf zurückgeführt werden, daß möglicherweise notwendige

Komponenten durch das Überangebot an Cofaktor aus dem Transkriptionskomplex entfernt werden. Diese Vermutung setzt eine direkte Interaktion zwischen 116 und weiteren an der Transkription beteiligten Proteinen voraus. In alternativen Ansätzen sollte durch Überexpression der Domäne, welche die Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor vermittelt, die Bindung des endogenen 116 Proteins an den Rezeptor spezifisch blockiert werden, um auf diese Weise zu verhindern, daß das endogene Protein seine Funktion bei der Transaktivierung wahrnehmen kann. Ähnliche Ansätze wurden auch bei der Untersuchung von SRC durchgeföhrt, wo gezeigt werden konnte, daß die Expression der Interaktionsdomäne die Funktion des vollständigen Coaktivators unterdrückt (Onate et al., 1995). Die transiente Transfektion der verkürzten 116 Proteine zeigt jedoch nur einen geringen Einfluß, der zudem nicht ausschließlich die hormonstimulierte Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor, sondern genauso die Transkription eines Reportergens mit einem Promotor ohne Progesteron responsible Elemente betrifft (s. Abb. 26). In diesem System zeigt 116 keine Eigenschaften als Cofaktor des Progesteron-Rezeptors. Daß 116 in einem System mit veränderter Promotor- und Zellspezifität auf Grund der gezeigten Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor nicht doch Eigenschaften eines Cofaktors der hormonellen Transkriptionsregulation offenbart, ist an Hand der durchgeföhrteten Analysen nicht auszuschließen. Im Rahmen dieser Arbeit konnte aber die Beteiligung von 116 an der Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung nicht bewiesen werden.

ZUSAMMENFASSUNG

Im Rahmen dieser Arbeit wurden zwei zuvor identifizierte putative Cofaktoren der Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung, 1142 und 116, hinsichtlich verschiedener biologischer und biochemischer Eigenschaften, aber insbesondere im Hinblick auf eine Beteiligung an der aktivierten Transkription, charakterisiert. Für 114-2 wurde eine cDNA von 5947 bp isoliert, die in einem offenen Leserahmen 1746 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 194,7 kD codieren. Datenbank-Vergleiche geben Hinweise auf eine bicistronische mRNA von 114-2 und KIAA0480. Das Gen von 114-2 ist wahrscheinlich auf dem humanen Chromosom 1 lokalisiert und durch ein Intron vom dem codierenden Bereich von KIAA0480 getrennt. *In vitro* Interaktionsanalysen konnten eine Interaktion mit dem Progesteron-Rezeptor nicht bestätigen. Durch Reporteranalysen konnte nach transienter Transfektion auch kein Einfluß auf die Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor gezeigt werden.

Für 116 wurde eine cDNA von 1693 bp isoliert, die in einem offenen Leserahmen 450 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 52,8 kDa codieren. Das Gen von 116 ist auf dem humanen Chromosom 7q31 lokalisiert, überspannt in zwölf Exons einen genomischen Bereich von etwa 100 kb und ist nur in einer Kopie im Genom vorhanden. Northern-Analysen bestätigten die Größe der cDNA und zeigten zusätzlich Transkripte mit Größen bis zu 7 kb. 116 ist ubiquitär exprimiert und das Protein cytoplasmatisch lokalisiert. Das Protein von 116 besitzt fünf potentielle Zinkfinger, eine DNA-Bindung konnte *in vitro* jedoch nicht detektiert werden. *In vitro* Interaktionsanalysen konnten die potentielle Dimerisierung von 116 zeigen, sowie die Wechselwirkung mit dem Progesteron-Rezeptor bestätigen und die Domänen, die für die Interaktion sowohl auf der Seite von 116 als auch auf der Seite des Rezeptors verantwortlich sind, näher eingrenzen. Die Wechselwirkung zwischen 116 und dem Progesteron-Rezeptor *in vivo* konnte an Hand von Coimmunpräzipitationen jedoch nicht nachgewiesen werden. Im Hinblick auf die Transkriptionsinitiation konnte an Hand von Reporteranalysen nach transienter Transfektion keine eigene Aktivierungsfunktion von 116 ermittelt werden. Es zeigte sich auch kein Einfluß des vollständigen 116 Proteins aber von einzelnen Domänen auf die hormonabhängige Transaktivierung durch den Progesteron-Rezeptor. Für beide putativen Cofaktoren konnte im Rahmen dieser Arbeit keine Beteiligung an der Progesteron-Rezeptor vermittelten Transaktivierung nachgewiesen werden.

LITERATURVERZEICHNIS

- Alloul, N. and Sherman, L. (1999). The E2 protein of human papillomavirus type 16 is translated from a variety of differentially spliced polycistronic mRNAs. *J.Gen.Virol.* 80, 29-37.
- Alroy, I. and Freedman, L.P. (1992). DNA binding analysis of glucocorticoid receptor specificity mutants. *Nucleic.Acids.Res.* 20, 1045-1052.
- Anzick, S.L., Kononen, J., Walker, R.L., Azorsa, D.O., Tanner, M.M., Guan, X.Y., Sauter, G., Kallioniemi, O.P., Trent, J.M., and Meltzer, P.S. (1997). AIB1, a steroid receptor coactivator amplified in breast and ovarian cancer. *Science* 277, 965-968.
- Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D., Seidman, J.G., Smith, J.A., and Struhl, K. (1991). Current protocols in molecular biology (New York: Greene publishing associates and Wiley-interscience).
- Baniahmad, A., Ha, I., Reinberg, D., Tsai, S., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1993). Interaction of human thyroid hormone receptor beta with transcription factor TFIIB may mediate target gene derepression and activation by thyroid hormone. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 90, 8832-8836.
- Beato, M. and Sanchez-Pacheco, A. (1996). Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex. *Endocr.Rev.* 17, 587-609.
- Blanco, J.C., Minucci, S., Lu, J., Yang, X.J., Walker, K.K., Chen, H., Evans, R.M., Nakatani, Y., and Ozato, K. (1998). The histone acetylase PCAF is a nuclear receptor coactivator. *Genes Dev.* 12, 1638-1651.
- Bocquel, M.T., Kumar, V., Stricker, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1989). The contribution of the N- and C-terminal regions of steroid receptors to activation of transcription is both receptor and cell-specific. *Nucleic.Acids.Res.* 17, 2581-2595.
- Bohen, S.P. (1995a). Hsp90 mutants disrupt glucocorticoid receptor ligand binding and destabilize aporeceptor complexes. *J.Biol.Chem.* 270, 29433-29438.
- Bohen, S.P., Kralli, A., and Yamamoto, K.R. (1995b). Hold 'em and fold 'em: chaperones and signal transduction [comment]. *Science* 268, 1303-1304.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.* 72:248-54, 248-254.
- Buratowski, S., Hahn, S., Guarente, L., and Sharp, P.A. (1989). Five intermediate complexes in transcription initiation by RNA polymerase II. *Cell* 56, 549-561.
- Buratowski, S., Hahn, S., Sharp, P.A., and Guarente, L. (1988). Function of a yeast TATA element-binding protein in a mammalian transcription system. *Nature* 334, 37-42.
- Burke, T.W. and Kadonaga, J.T. (1996). Drosophila TFIID binds to a conserved downstream basal promoter element that is present in many TATA-box-deficient promoters. *Genes Dev.* 10, 711-724.
- Cato, A.C., Heitlinger, E., Ponta, H., Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U., Bailly, A., Rauch, C., and Milgrom, E. (1988). Estrogen and progesterone receptor-binding sites on the chicken vitellogenin II gene: synergism of steroid hormone action. *Mol.Cell Biol.* 8, 5323-5330.
- Cavailles, V., Dauvois, S., Danielian, P.S., and Parker, M.G. (1994). Interaction of proteins with transcriptionally active estrogen receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91, 10009-10013.
- Cavailles, V., Dauvois, S., Horset, F., Lopez, G., Hoare, S., Kushner, P.J., and Parker, M.G. (1995). Nuclear factor RIP140 modulates transcriptional activation by the estrogen receptor. *EMBO J.* 14, 3741-3751.
- Chambon, P. (1975). Eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Annu.Rev.Biochem.* 44:613-38, 613-638.

- Chang, K.H., Chen, Y., Chen, T.T., Chou, W.H., Chen, P.L., Ma, Y.Y., Yang-Feng, T.L., Leng, X., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., and Lee, W.H. (1997). A thyroid hormone receptor coactivator negatively regulated by the retinoblastoma protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 9040-9045.
- Chen, H., Lin, R.J., Schiltz, R.L., Chakravarti, D., Nash, A., Nagy, L., Privalsky, M.L., Nakatani, Y., and Evans, R.M. (1997). Nuclear receptor coactivator ACTR is a novel histone acetyltransferase and forms a multimeric activation complex with P/CAF and CBP/p300. *Cell* 90, 569-580.
- Conaway, R.C. and Conaway, J.W. (1993). General initiation factors for RNA polymerase II. *Annu.Rev.Biochem.* 62:161-90, 161-190.
- Danielian, P.S., White, R., Lees, J.A., and Parker, M.G. (1992). Identification of a conserved region required for hormone dependent transcriptional activation by steroid hormone receptors [published erratum appears in *EMBO J* 1992 Jun;11(6):2366]. *EMBO J.* 11, 1025-1033.
- Darimont, B.D., Wagner, R.L., Apriletti, J.W., Stallcup, M.R., Kushner, P.J., Baxter, J.D., Fletterick, R.J., and Yamamoto, K.R. (1998). Structure and specificity of nuclear receptor-coactivator interactions. *Genes Dev.* 12, 3343-3356.
- DeMarzo, A.M., Beck, C.A., Onate, S.A., and Edwards, D.P. (1991). Dimerization of mammalian progesterone receptors occurs in the absence of DNA and is related to the release of the 90-kDa heat shock protein. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 72-76.
- Dickinson, P., Cook, P.R., and Jackson, D.A. (1990). Active RNA polymerase I is fixed within the nucleus of HeLa cells. *EMBO J.* 9, 2207-2214.
- Dynlacht, B.D., Hoey, T., and Tjian, R. (1991). Isolation of coactivators associated with the TATA-binding protein that mediate transcriptional activation. *Cell* 66, 563-576.
- Eggert, M., Mows, C.C., Tripier, D., Arnold, R., Michel, J., Nickel, J., Schmidt, S., Beato, M., and Renkawitz, R. (1995). A fraction enriched in a novel glucocorticoid receptor-interacting protein stimulates receptor-dependent transcription in vitro. *J.Biol.Chem.* 270, 30755-30759.
- Elashry-Stowers, D., Zava, D.T., Speers, W.C., and Edwards, D.P. (1988). Immunocytochemical localization of progesterone receptors in breast cancer with anti-human receptor monoclonal antibodies. *Cancer Res.* 48, 6462-6474.
- Evans, R.M. (1988). The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889-895.
- Feng, W., Ribeiro, R.C., Wagner, R.L., Nguyen, H., Apriletti, J.W., Fletterick, R.J., Baxter, J.D., Kushner, P.J., and West, B.L. (1998). Hormone-dependent coactivator binding to a hydrophobic cleft on nuclear receptors. *Science* 280, 1747-1749.
- Fields, S. and Song, O. (1989). A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Freedman, L.P. (1992). Anatomy of the steroid receptor zinc finger region. *Endocr.Rev.* 13, 129-145.
- Geiduschek, E.P. and Tocchini-Valentini, G.P. (1988). Transcription by RNA polymerase III. *Annu.Rev.Biochem.* 57:873-914, 873-914.
- Georgopoulos, K., Winandy, S., and Avitahl, N. (1997). The role of the Ikaros gene in lymphocyte development and homeostasis. *Annu.Rev.Immunol.* 15:155-76, 155-176.
- Giguere, V., Hollenberg, S.M., Rosenfeld, M.G., and Evans, R.M. (1986). Functional domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 46, 645-652.
- Gill, G., Pascal, E., Tseng, Z.H., and Tjian, R. (1994). A glutamine-rich hydrophobic patch in transcription factor Sp1 contacts the dTAFII110 component of the Drosophila TFIID complex and mediates transcriptional activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 91, 192-196.

- Godowski, P.J., Picard, D., and Yamamoto, K.R. (1988). Signal transduction and transcriptional regulation by glucocorticoid receptor-LexA fusion proteins. *Science* 241, 812-816.
- Goodrich, J.A., Cutler, G., and Tjian, R. (1996). Contacts in context: promoter specificity and macromolecular interactions in transcription. *Cell* 84, 825-830.
- Goodrich, J.A., Hoey, T., Thut, C.J., Admon, A., and Tjian, R. (1993). Drosophila TAFII40 interacts with both a VP16 activation domain and the basal transcription factor TFIIB. *Cell* 75, 519-530.
- Green, S. and Chambon, P. (1986). A superfamily of potentially oncogenic hormone receptors [news]. *Nature* 324, 615-617.
- Guiochon-Mantel, A., Loosfelt, H., Lescop, P., Sar, S., Atger, M., Perrot-Applanat, M., and Milgrom, E. (1989). Mechanisms of nuclear localization of the progesterone receptor: evidence for interaction between monomers. *Cell* 57, 1147-1154.
- Hagemeier, C., Walker, S., Caswell, R., Kouzarides, T., and Sinclair, J. (1992). The human cytomegalovirus 80-kilodalton but not the 72-kilodalton immediate-early protein transactivates heterologous promoters in a TATA box-dependent mechanism and interacts directly with TFIID. *J.Virol.* 66, 4452-4456.
- Halachmi, S., Marden, E., Martin, G., MacKay, H., Abbondanza, C., and Brown, M. (1994). Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* 264, 1455-1458.
- Hamamori, Y., Sartorelli, V., Ogryzko, V., Puri, P.L., Wu, H.Y., Wang, J.Y., Nakatani, Y., and Kedes, L. (1999). Regulation of histone acetyltransferases p300 and PCAF by the bHLH protein twist and adenoviral oncoprotein E1A. *Cell* 96, 405-413.
- Hansen, S.K., Takada, S., Jacobson, R.H., Lis, J.T., and Tjian, R. (1997). Transcription properties of a cell type-specific TATA-binding protein, TRF [see comments]. *Cell* 91, 71-83.
- Hanstein, B., Eckner, R., DiRenzo, J., Halachmi, S., Liu, H., Searcy, B., Kurokawa, R., and Brown, M. (1996). p300 is a component of an estrogen receptor coactivator complex. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 11540-11545.
- Hayashi, Y., Ohmori, S., Ito, T., and Seo, H. (1997). A splicing variant of Steroid Receptor Coactivator-1 (SRC-1E): the major isoform of SRC-1 to mediate thyroid hormone action. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 236, 83-87.
- Heery, D.M., Kalkhoven, E., Hoare, S., and Parker, M.G. (1997). A signature motif in transcriptional co-activators mediates binding to nuclear receptors [see comments]. *Nature* 387, 733-736.
- Hernandez, N. (1993). TBP, a universal eukaryotic transcription factor? *Genes Dev.* 7, 1291-1308.
- Hoey, T., Weinzierl, R.O., Gill, G., Chen, J.L., Dynlacht, B.D., and Tjian, R. (1993). Molecular cloning and functional analysis of Drosophila TAF110 reveal properties expected of coactivators. *Cell* 72, 247-260.
- Hollenberg, S.M. and Evans, R.M. (1988). Multiple and cooperative trans-activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 55, 899-906.
- Hong, H., Darimont, B.D., Ma, H., Yang, L., Yamamoto, K.R., and Stallcup, M.R. (1999). An additional region of coactivator GRIP1 required for interaction with the hormone-binding domains of a subset of nuclear receptors. *J.Biol.Chem.* 274, 3496-3502.
- Hong, H., Kohli, K., Garabedian, M.J., and Stallcup, M.R. (1997). GRIP1, a transcriptional coactivator for the AF-2 transactivation domain of steroid, thyroid, retinoid, and vitamin D receptors. *Mol.Cell Biol.* 17, 2735-2744.
- Hong, H., Kohli, K., Trivedi, A., Johnson, D.L., and Stallcup, M.R. (1996). GRIP1, a novel mouse protein that serves as a transcriptional coactivator in yeast for the hormone binding domains of steroid receptors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 4948-4952.

- Horikoshi, N., Maguire, K., Kralli, A., Maldonado, E., Reinberg, D., and Weinmann, R. (1991). Direct interaction between adenovirus E1A protein and the TATA box binding transcription factor IID. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 88, 5124-5128.
- Horset, F., Dauvois, S., Heery, D.M., Cavailles, V., and Parker, M.G. (1996). RIP-140 interacts with multiple nuclear receptors by means of two distinct sites. *Mol.Cell Biol.* 16, 6029-6036.
- Ing, N.H., Beekman, J.M., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1992). Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J.Biol.Chem.* 267, 17617-17623.
- Jacq, X., Brou, C., Lutz, Y., Davidson, I., Chambon, P., and Tora, L. (1994). Human TAFII30 is present in a distinct TFIID complex and is required for transcriptional activation by the estrogen receptor. *Cell* 79, 107-117.
- Kahmann, S., Vassen, L., and Klein-Hitpass, L. (1998). Synergistic enhancement of PRB-mediated RU486 and R5020 agonist activities through cyclic adenosine 3',5'-monophosphate represents a delayed primary response. *Mol.Endocrinol.* 12, 278-289.
- Kamei, Y., Xu, L., Heinzel, T., Torchia, J., Kurokawa, R., Gloss, B., Lin, S.C., Heyman, R.A., Rose, D.W., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1996). A CBP integrator complex mediates transcriptional activation and AP-1 inhibition by nuclear receptors. *Cell* 85, 403-414.
- Klein-Hitpass, L., Ryffel, G.U., Heitlinger, E., and Cato, A.C. (1988). A 13 bp palindrome is a functional estrogen responsive element and interacts specifically with estrogen receptor. *Nucleic.Acids.Res.* 16, 647-663.
- Klein-Hitpass, L., Tsai, S.Y., Greene, G.L., Clark, J.H., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1989). Specific binding of estrogen receptor to the estrogen response element. *Mol.Cell Biol.* 9, 43-49.
- Klemm, R.D., Goodrich, J.A., Zhou, S., and Tjian, R. (1995). Molecular cloning and expression of the 32-kDa subunit of human TFIID reveals interactions with VP16 and TFIIB that mediate transcriptional activation. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 92, 5788-5792.
- Klotzbücher, M., Schwerk, C., Holewa, B., and Klein-Hitpass, L. (1997). Activation of transcription by progesterone receptor involves derepression of activation functions by a cofactor. *Mol.Endocrinol.* 11, 768-778.
- Koleske, A.J. and Young, R.A. (1994). An RNA polymerase II holoenzyme responsive to activators [see comments]. *Nature* 368, 466-469.
- Krust, A., Green, S., Argos, P., Kumar, V., Walter, P., Bornert, J.M., and Chambon, P. (1986). The chicken oestrogen receptor sequence: homology with v-erbA and the human oestrogen and glucocorticoid receptors. *EMBO J.* 5, 891-897.
- Kumar, V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J.R., and Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell* 51, 941-951.
- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lagrange, T., Kapanidis, A.N., Tang, H., Reinberg, D., and Ebright, R.H. (1998). New core promoter element in RNA polymerase II-dependent transcription: sequence-specific DNA binding by transcription factor IIB. *Genes Dev.* 12, 34-44.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1999). A steroid receptor coactivator, SRA, functions as an RNA and is present in an SRC-1 complex. *Cell* 97, 17-27.
- Li, H., Gomes, P.J., and Chen, J.D. (1997). RAC3, a steroid/nuclear receptor-associated coactivator that is related to SRC-1 and TIF2. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 94, 8479-8484.
- Lin, Y.S., Ha, I., Maldonado, E., Reinberg, D., and Green, M.R. (1991). Binding of general transcription factor TFIIB to an acidic activating region. *Nature* 353, 569-571.

- Luisi, B.F., Xu, W.X., Otwinowski, Z., Freedman, L.P., Yamamoto, K.R., and Sigler, P.B. (1991). Crystallographic analysis of the interaction of the glucocorticoid receptor with DNA [see comments]. *Nature* 352, 497-505.
- Martinez-Balbas, M.A., Bannister, A.J., Martin, K., Haus-Seuffert, P., Meisterernst, M., and Kouzarides, T. (1998). The acetyltransferase activity of CBP stimulates transcription. *EMBO J.* 17, 2886-2893.
- Matsui, T., Segall, J., Weil, P.A., and Roeder, R.G. (1980). Multiple factors required for accurate initiation of transcription by purified RNA polymerase II. *J.Biol.Chem.* 255, 11992-11996.
- McInerney, E.M., Rose, D.W., Flynn, S.E., Westin, S., Mullen, T.M., Krones, A., Inostroza, J., Torchia, J., Nolte, R.T., Assa-Munt, N., Milburn, M.V., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1998). Determinants of coactivator LXXLL motif specificity in nuclear receptor transcriptional activation. *Genes Dev.* 12, 3357-3368.
- McInerney, E.M., Tsai, M.J., O'Malley, B.W., and Katzenellenbogen, B.S. (1996). Analysis of estrogen receptor transcriptional enhancement by a nuclear hormone receptor coactivator. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 93, 10069-10073.
- Meyer, M.E., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Bocquel, M.T., Tasset, D., and Chambon, P. (1989). Steroid hormone receptors compete for factors that mediate their enhancer function. *Cell* 57, 433-442.
- Moilanen, A.M., Karvonen, U., Poukka, H., Yan, W., Toppari, J., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (1999). A testis-specific androgen receptor coregulator that belongs to a novel family of nuclear proteins. *J.Biol.Chem.* 274, 3700-3704.
- Moilanen, A.M., Poukka, H., Karvonen, U., Hakli, M., Janne, O.A., and Palvimo, J.J. (1998). Identification of a novel RING finger protein as a coregulator in steroid receptor-mediated gene transcription. *Mol.Cell Biol.* 18, 5128-5139.
- Morgan, B., Sun, L., Avitahl, N., Andrikopoulos, K., Ikeda, T., Gonzales, E., Wu, P., Neben, S., and Georgopoulos, K. (1997). Aiolos, a lymphoid restricted transcription factor that interacts with Ikaros to regulate lymphocyte differentiation. *EMBO J.* 16, 2004-2013.
- Myer, V.E. and Young, R.A. (1998). RNA polymerase II holoenzymes and subcomplexes. *J.Biol.Chem.* 273, 27757-27760.
- Okuda, A., Fukushima, A., Nishimoto, M., Orimo, A., Yamagishi, T., Nabeshima, Y., Kuro, Nabeshima, Y., Boon, K., Keaveney, M., Stunnenberg, H.G., and Muramatsu, M. (1998). UTF1, a novel transcriptional coactivator expressed in pluripotent embryonic stem cells and extra-embryonic cells. *EMBO J.* 17, 2019-2032.
- Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1995). Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily. *Science* 270, 1354-1357.
- Orphanides, G., Lagrange, T., and Reinberg, D. (1996). The general transcription factors of RNA polymerase II. *Genes Dev.* 10, 2657-2683.
- Orti, E., Bodwell, J.E., and Munck, A. (1992). Phosphorylation of steroid hormone receptors. *Endocr.Rev.* 13, 105-128.
- Pfützner, E., Sak, A., Ulber, V., Ryffel, G.U., and Klein-Hitpass, L. (1993). Recombinant activation domains of virion protein 16 and human estrogen receptor generate transcriptional interference in vitro by distinct mechanisms. *Mol.Endocrinol.* 7, 1061-1071.
- Picard, D. and Yamamoto, K.R. (1987). Two signals mediate hormone-dependent nuclear localization of the glucocorticoid receptor. *EMBO J.* 6, 3333-3340.
- Pratt, W.B. (1993). The role of heat shock proteins in regulating the function, folding, and trafficking of the glucocorticoid receptor. *J.Biol.Chem.* 268, 21455-21458.

- Pratt, W.B., Jolly, D.J., Pratt, D.V., Hollenberg, S.M., Giguere, V., Cadepond, F.M., Schweizer-Groyer, G., Catelli, M.G., Evans, R.M., and Baulieu, E.E. (1988). A region in the steroid binding domain determines formation of the non- DNA-binding, 9 S glucocorticoid receptor complex. *J.Biol.Chem.* 263, 267-273.
- Proudfoot, N. (1991). Poly(A) signals. *Cell* 64, 671-674.
- Pugh, B.F. and Tjian, R. (1990). Mechanism of transcriptional activation by Sp1: evidence for coactivators. *Cell* 61, 1187-1197.
- Rabenstein, M.D., Zhou, S., Lis, J.T., and Tjian, R. (1999). TATA box-binding protein (TBP)-related factor 2 (TRF2), a third member of the TBP family. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 96, 4791-4796.
- Ranish, J.A., Yudkovsky, N., and Hahn, S. (1999). Intermediates in formation and activity of the RNA polymerase II preinitiation complex: holoenzyme recruitment and a postrecruitment role for the TATA box and TFIIB. *Genes Dev.* 13, 49-63.
- Reddy, R., Henning, D., Das, G., Harless, M., and Wright, D. (1987). The capped U6 small nuclear RNA is transcribed by RNA polymerase III. *J.Biol.Chem.* 262, 75-81.
- Reiss, J., Christensen, E., Kurlemann, G., Zabot, M.T., and Dorche, C. (1998). Genomic structure and mutational spectrum of the bicistronic MOCS1 gene defective in molybdenum cofactor deficiency type A. *Hum.Genet.* 103, 639-644.
- Roeder, R.G. (1996). The role of general initiation factors in transcription by RNA polymerase II. *Trends.Biochem.Sci.* 21, 327-335.
- Roeder, R.G., Schwartz, L.B., and Sklar, V.E. (1976). Function, structure, and regulation of eukaryotic nuclear RNA polymerases. *Symp.Soc.Dev.Biol.* 29-52.
- Sadovsky, Y., Webb, P., Lopez, G., Baxter, J.D., Fitzpatrick, P.M., Gizang-Ginsberg, E., Cavailles, V., Parker, M.G., and Kushner, P.J. (1995). Transcriptional activators differ in their responses to overexpression of TATA-box-binding protein. *Mol.Cell Biol.* 15, 1554-1563.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular cloning: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press).
- Schwerk, C. Identifizierung von Interaktionspartnern bei der Transkriptionsaktivierung durch Kern-Rezeptoren. Dissertation 1996.
- Schwerk, C., Klotzbücher, M., Sachs, M., Ulber, V., and Klein-Hitpass, L. (1995). Identification of a transactivation function in the progesterone receptor that interacts with the TAFII110 subunit of the TFIID complex. *J.Biol.Chem.* 270, 21331-21338.
- Sharp, P.A. (1985). On the origin of RNA splicing and introns. *Cell* 42, 397-400.
- Sheridan, P.L., Evans, R.M., and Horwitz, K.B. (1989). Phosphotryptic peptide analysis of human progesterone receptor. New phosphorylated sites formed in nuclei after hormone treatment. *J.Biol.Chem.* 264, 6520-6528.
- Sloan, J., Kinghorn, J.R., and Unkles, S.E. (1999). The two subunits of human molybdopterin synthase: evidence for a bicistronic messenger RNA with overlapping reading frames. *Nucleic.Acids.Res.* 27, 854-858.
- Smale, S.T. and Baltimore, D. (1989). The "initiator" as a transcription control element. *Cell* 57, 103-113.
- Smith, D.F. and Toft, D.O. (1993). Steroid receptors and their associated proteins. *Mol.Endocrinol.* 7, 4-11.
- Spencer, T.E., Jenster, G., Burcin, M.M., Allis, C.D., Zhou, J., Mizzen, C.A., McKenna, N.J., Onate, S.A., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1997). Steroid receptor coactivator-1 is a histone acetyltransferase. *Nature* 389, 194-198.

- Spritz, R.A., Jagadeeswaran, P., Choudary, P.V., Biro, P.A., Elder, J.T., deRiel, J.K., Manley, J.L., Gefer, M.L., Forget, B.G., and Weissman, S.M. (1981). Base substitution in an intervening sequence of a beta+-thalassemic human globin gene. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 78, 2455-2459.
- Strahle, U., Klock, G., and Schütz, G. (1987). A DNA sequence of 15 base pairs is sufficient to mediate both glucocorticoid and progesterone induction of gene expression. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 84, 7871-7875.
- Stringer, K.F., Ingles, C.J., and Greenblatt, J. (1990). Direct and selective binding of an acidic transcriptional activation domain to the TATA-box factor TFIID. *Nature* 345, 783-786.
- Sun, L., Liu, A., and Georgopoulos, K. (1996). Zinc finger-mediated protein interactions modulate Ikaros activity, a molecular control of lymphocyte development. *EMBO J.* 15, 5358-5369.
- Takeda, J., Yano, H., Eng, S., Zeng, Y., and Bell, G.I. (1993). A molecular inventory of human pancreatic islets: sequence analysis of 1000 cDNA clones. *Hum.Mol.Genet.* 2, 1793-1798.
- Takeshita, A., Yen, P.M., Misiti, S., Cardona, G.R., Liu, Y., and Chin, W.W. (1996). Molecular cloning and properties of a full-length putative thyroid hormone receptor coactivator. *Endocrinology* 137, 3594-3597.
- Tanese, N. and Tjian, R. (1993). Coactivators and TAFs: a new class of eukaryotic transcription factors that connect activators to the basal machinery. *Cold Spring Harb.Symp.Quant.Biol.* 58:179-85, 179-185.
- Tjian, R. and Maniatis, T. (1994). Transcriptional activation: a complex puzzle with few easy pieces. *Cell* 77, 5-8.
- Tora, L., Gronemeyer, H., Turcotte, B., Gaub, M.P., and Chambon, P. (1988). The N-terminal region of the chicken progesterone receptor specifies target gene activation. *Nature* 333, 185-188.
- Torchia, J., Rose, D.W., Inostroza, J., Kamei, Y., Westin, S., Glass, C.K., and Rosenfeld, M.G. (1997). The transcriptional co-activator p/CIP binds CBP and mediates nuclear- receptor function [see comments]. *Nature* 387, 677-684.
- Tremblay, A., Tremblay, G.B., Labrie, F., and Giguere, V. (1999). Ligand-independent recruitment of SRC-1 to estrogen receptor beta through phosphorylation of activation function AF-1. *Mol.Cell* 3, 513-519.
- Treuter, E., Albrechtsen, T., Johansson, L., Leers, J., and Gustafsson, J.A. (1998). A regulatory role for RIP140 in nuclear receptor activation. *Mol.Endocrinol.* 12, 864-881.
- Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. (1994). Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members. *Annu.Rev.Biochem.* 63:451-86, 451-486.
- Verrijzer, C.P., Yokomori, K., Chen, J.L., and Tjian, R. (1994). Drosophila TAFII150: similarity to yeast gene TSM-1 and specific binding to core promoter DNA. *Science* 264, 933-941.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Tini, M., Vivat, V., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1998). The coactivator TIF2 contains three nuclear receptor-binding motifs and mediates transactivation through CBP binding-dependent and -independent pathways. *EMBO J.* 17, 507-519.
- Voegel, J.J., Heine, M.J., Zechel, C., Chambon, P., and Gronemeyer, H. (1996). TIF2, a 160 kDa transcriptional mediator for the ligand-dependent activation function AF-2 of nuclear receptors. *EMBO J.* 15, 3667-3675.
- von der Ahe, A.D., Janich, S., Scheidereit, C., Renkawitz, R., Schütz, G., and Beato, M. (1985). Glucocorticoid and progesterone receptors bind to the same sites in two hormonally regulated promoters. *Nature* 313, 706-709.
- Weil, P.A., Segall, J., Harris, B., Ng, S.Y., and Roeder, R.G. (1979). Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J.Biol.Chem.* 254, 6163-6173.
- Weinmann, R. and Roeder, R.G. (1974). Role of DNA-dependent RNA polymerase 3 in the transcription of the tRNA and 5S RNA genes. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* 71, 1790-1794.
- Weis, L. and Reinberg, D. (1992). Transcription by RNA polymerase II: initiator-directed formation of transcription-competent complexes. *FASEB J.* 6, 3300-3309.

- Woychik, N.A. and Young, R.A. (1990). RNA polymerase II: subunit structure and function. *Trends.Biochem.Sci.* *15*, 347-351.
- Xiao, H., Pearson, A., Coulombe, B., Truant, R., Zhang, S., Regier, J.L., Triezenberg, S.J., Reinberg, D., Flores, O., and Ingles, C.J. (1994). Binding of basal transcription factor TFIID to the acidic activation domains of VP16 and p53. *Mol.Cell Biol.* *14*, 7013-7024.
- Xu, J., Qiu, Y., DeMayo, F.J., Tsai, S.Y., Tsai, M.J., and O'Malley, B.W. (1998). Partial hormone resistance in mice with disruption of the steroid receptor coactivator-1 (SRC-1) gene. *Science* *279*, 1922-1925.
- Yao, T.P., Ku, G., Zhou, N., Scully, R., and Livingston, D.M. (1996). The nuclear hormone receptor coactivator SRC-1 is a specific target of p300. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *93*, 10626-10631.
- Yeh, S. and Chang, C. (1996). Cloning and characterization of a specific coactivator, ARA70, for the androgen receptor in human prostate cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *93*, 5517-5521.
- Zawel, L. and Reinberg, D. (1993). Initiation of transcription by RNA polymerase II: a multi-step process. *Prog.Nucleic.Acid.Res.Mol.Biol.* *44:67-108*, 67-108.
- Zeiner, M., Gebauer, M., and Gehring, U. (1997). Mammalian protein RAP46: an interaction partner and modulator of 70 kDa heat shock proteins. *EMBO J.* *16*, 5483-5490.
- Zeiner, M. and Gehring, U. (1995). A protein that interacts with members of the nuclear hormone receptor family: identification and cDNA cloning. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.* *92*, 11465-11469.
- Zieve, G., Benecke, B.J., and Penman, S. (1977). Synthesis of two classes of small RNA species in vivo and in vitro. *Biochemistry* *16*, 4520-4525.
- Zwijnen, R.M., Buckle, R.S., Hijmans, E.M., Loomans, C.J., and Bernards, R. (1998). Ligand-independent recruitment of steroid receptor coactivators to estrogen receptor by cyclin D1. *Genes Dev.* *12*, 3488-3498.

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.	Abbildung
AF	Aktivierungsfunktion
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
Ci	Curie
DMEM	Dulbecco's modifiziertes Eagle's Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosid-5'Triphosphat
et al.	und andere
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
g	Erdbeschleunigung
GTF	Genereller Transkriptionsfaktor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
kD	Kilodalton
LB	Luria-Bertanis-Broth
luc	Luziferase
min	Minute(n)
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PIPES	Piperazin-N,N' bis-[2-Ethansulfonsäure]
RNA	Ribonukleinsäure
SDS	Natriumdodecylsulfat
SR	Steroidhormon-Rezeptor
Tab.	Tabelle
TAF	TBP assoziierter Faktor
TBP	TATA-Box bindendes Protein
rpm	Umdrehungen pro Minute

DANKSAGUNG

Bei Herrn PD Dr. Ludger Klein-Hitpaß möchte ich mich sehr für die Überlassung des interessanten Themas, sein großes Engagement bei der Betreuung und seine ständige Gesprächsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gilt auch Fabian Esser, Sabine Kahman, Christian Schwerk, Lothar Vaßen, Dorothée Borgmeier und Wojtek Wegrzyn für den Spaß bei der Arbeit und für ihre Hilfe im Labor.

Allen derzeitigen und früheren Mitarbeitern der AG III danke ich für die interessanten Gespräche, die wirklich gute Zusammenarbeit und ihre Freundschaft innerhalb und außerhalb der Labore.

Ich bedanke mich auch bei allen übrigen Mitarbeitern der Institute für Zellund Molekularbiologie, die mir mit Rat und Tat zur Seite standen, besonders bei Michael Derda, der mir in Sachen Bestellungen so manches mal „aus der Patsche“ geholfen hat.

Mein herzlichster Dank gilt Heike Thomas für ihre weitreichende Unterstützung, für die vielen Gespräche und für den Ansporn und die Ermunterungen, die entscheidend waren für das Gelingen dieser Arbeit.

Meinen Eltern möchte ich für all ihre Mühen danken, die mir diesen Weg ermöglicht haben, den sie zusammen mit mir nicht mehr erleben durften.

LEBENS LAUF

Name:	Diemo Michels	
Geburtstag:	23.04.1970	
Geburtsort:	Bochum	
Familienstand:	ledig	
Staatsangehörigkeit:	deutsch	
Schulbildung:	1976 – 1980	Grundschule an der Hufelandstraße in Bochum
	1980 – 1989	Albert-Einstein-Schule in Bochum
	11.05.1989	Allgemeine Hochschulreife
Grundwehrdienst:	05.06.1989 – 31.08.1990	
Studium:	1990 – 1992	Grundstudium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
	07.10.1992	Diplomvorprüfung
	1992 – 1996	Hauptstudium der Chemie an der Ruhr-Universität Bochum
	Mai 1995 – Januar 1996	Anfertigung der Diplomarbeit „Untersuchungen zur RNA-Synthese in Hefezellen“ am Lehrstuhl für Biochemie der Fakultät für Chemie unter der Betreuung von Prof. Dr. B.-J. Benecke
	29.01.96	Studienabschluß als Diplom-Chemiker
	seit Mai 1996	Dissertation am Institut für Zellbiologie des Universitätsklinikums Essen unter der Betreuung von PD Dr. L. Klein-Hitpaß

